

Aus dem Bereich der  
Haemostaseologie und Transfusionsmedizin  
Fachbereich 4 (Klinische Medizin)  
Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Einführung der Multikomponentenspende am  
Universitätsklinikum Homburg der Universität des Saarlandes  
-Pilotstudie-**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
**der medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2009

vorgelegt von:  
Corinna Lottmann  
Geboren am 01.01.1979  
in Saarbrücken

1. Tag der Promotion:
2. Dekan:
3. Berichterstatter :

## Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der inhaltlich- materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderen Personen) in Anspruch genommen.

Es hat keiner von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Saarbrücken,

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung .....	6
3. Material und Methodik.....	7
3.1 Spenderauswahl.....	7
3.2 Apheresesystem.....	8
3.3 Labormethoden.....	10
3.3.1 Nageotte-Kammerzählung (Leukozyten im Erythrozytenkonzentrat).....	
3.3.2 Nageotte-Kammerzählung (Leukozyten im Thrombozytenkonzentrat).....	
3.3.3 Neubauer-Kammerzählung.....	
3.3.4 PH-Messung.....	
3.3.5 Blutbild.....	
3.3.6 Bestimmung der Hämolyserate.....	
3.3.7 Erythrozyten-Aggregation.....	
3.3.8 Blutviskositätsmessung.....	
3.3.9 induzierte Thrombozytenaggregation.....	
3.3.10 ATP-Bestimmung.....	
3.3.11 PF4.....	
3.3.12 Enzymimmunoassey zur Bestimmung von Human- Thrombin-Antithrombin III-Komplex (Enzygnost TAT micro der Firma DADE Behring).....	
3.3.13 Elastase.....	
3.3.14 Beta-Thromboglobulin.....	
3.3.15 Messung des Anaphylatoxins C5a in Humanem Plasma.....	
3.3.16 Antithrombin III-Komplexe zur Diagnose von Blutgerinnungsstörungen.....	
3.4 Verwendete Statistik.....	11
<b>4. Ergebnisse und statistische Auswertung.....</b>	<b>12</b>
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>36</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>48</b>
<b>7. Dank.....</b>	<b>52</b>
<b>8. Lebenslauf.....</b>	<b>53</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>55</b>

## 1. Zusammenfassung

### Studiendesign

In einer Pilotstudie wurde ein neues Blutzellseparationsverfahren (MCS+, Haemonetics) zur Multikomponentenspende eingesetzt.

Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Wie ist die Praktikabilität des Verfahrens?
2. Wie ist die Qualität der hergestellten Produkte?

Es wurden von 20 Spendern je ein Erythrozytenkonzentrat und ein Thrombozytenkonzentrat hergestellt. Es wurden nicht nur die gesetzlichen Qualitätsvorgaben berücksichtigt, sondern zusätzliche Parameter zur Überprüfung der Qualität untersucht. Die Lagerung der Erythrozytenkonzentrate betrug 49 Tage, die der Thrombozytenkonzentrate 5 Tage.

Laborkontrollen erfolgten alle 10 Tage bei den Erythrozytenkonzentraten, bei den Thrombozytenkonzentraten an Tag 1, 3 und 5.

### Material und Methodik

Bei  $n = 20$  Spendern wurde bei einem diskontinuierlichen Spendeverfahren je ein Erythrozytenkonzentrat und ein Thrombozytenkonzentrat gewonnen unter Berücksichtigung des Ausgangs-Vollblutvolumens des Spenders und dessen relevanter Blutwerte. Dabei wurden die Richtlinien der Bundesärztekammer (BÄK) für die Zulassung der Personen zur Apherese und Vollblutspende als Einschlusskriterien angewandt.

Bei den Erythrozytenkonzentraten wurden nach Zugabe der Additivlösungen Hämatokritwerte von  $58\% \pm 3,35$  erreicht. Die Erythrozytenkonzentrate wurden dann über 49 Tage bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der Gehalt der Thrombozytenkonzentrate lag bei  $1,12 \cdot 10^9 / \text{l} \pm 264,92$  Thrombozyten pro Thrombozytenkonzentrat. Die Thrombozyten wurden über 5 Tage bei Raumtemperatur auf einem Zellagitator gelagert.

Untersuchungen wurden bei den Thrombozytenkonzentraten an Tag 1, 3 und 5 bei den Erythrozytenkonzentraten an Tag 0, 10, 20, 30, 40, 50 durchgeführt.

Die Statistik wurde mit dem F - Test für multiple Mittelwerte erstellt und in tabellarischer Form und Boxblottgraphik dargestellt.

## Ergebnisse

Die Produkte waren alle leukozytendepletiert, es fand sich keine komplementaktivierende Plättchenfunktion. Ebenso lagen sämtliche erhobenen Werte innerhalb der von der BÄK geforderten Grenzen bzw. überschritten den geforderten Mindestwert.

Lediglich der pH - Wert der Thrombozyten lag bei  $7,46 \pm 0,09$ .

Der Zeitaufwand für dieses Blutzellseparationsverfahren war sehr hoch, er lag bei  $108 \pm 3$  Minuten. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  festgelegt, da in der Arbeit keine Gaußsche Normalverteilung vorlag. Signifikant angestiegen waren die Ergebnisse für Thrombozyten/Erythrozytenkonzentrat, freies Hämoglobin, die Hämolyserate, das freie Kalium, Viskosität, pH und Komplementsystem. Signifikant abgefallen waren die Ergebnisse für Blut - ATP, Hb - ATP, Kollagen-induzierte Thrombozyten, ADP - induzierte Thrombozyten, ADP- und Suprarenin - induzierte Thrombozyten und den Plättchenfaktor 4.

## Schlussfolgerung

Mit diesem Verfahren konnten qualitativ hochwertige Produkte hergestellt werden, sodass kurzfristig die Nachfrage an EKs und TKs gedeckt werden konnte.

Vorteilhaft ist an diesem Verfahren eine geringere Zahl an unterschiedlichen Spendern und durchgeführten Prozeduren, da ein Spender Erythrozyten und Thrombozyten während einer Spende gleichzeitig spenden kann. Dieses Verfahren gewährleistet eine höhere Virussicherheit, weil ein Patient von einem Spender EK und TK erhält. Für Schwerpunktkrankenhäuser insbesondere Universitätskliniken, die in der Regel zwischen 50-70% ihrer Produkte zukaufen und deswegen zur Deckung des Bedarfs grundsätzlich Doppel-Thrombozytenkonzentrate herstellen, wirkt sich dieses Verfahren günstig auf die Haltbarkeit der Thrombozytenkonzentrate aus.

Außerdem muss für hochpreisige Blutprodukte nur einmal die Virussicherheitsprüfung durchgeführt werden

Aufgrund der hohen Personalbindung und der hohen Setpreise wird dieses Verfahren insbesondere in Unikliniken mit hohem Bedarf an Blutprodukten und besonderen Patientengruppen (Pädiatrie/ Immunsupprimierten) eingesetzt werden.

Diese neue Methode der Multikomponenten- Spende ermöglicht es den Blutspende- Instituten sich besser an der Nachfrage zu orientieren. Des Weiteren können die rekrutierten Spender, je nach gespendetem Produkt häufiger zur Spende zugelassen werden. (Thrombozyten dürfen

häufiger gespendet werden, als Erythrozyten oder Vollblut, da die Thrombozytenregeneration in vivo nicht so lange dauert.)

Daraus folgt, dass die Zahl der benötigten Spender geringer ist, als bei Vollblutspendern, um bei diesem differenzierten Herstellen den Bedarf an den nachgefragten Produkten zu garantieren.

## Summary

### Design of the study

In a pilot study, a new blood cell separation system (MCS+, Haemonetics) was used for multiple donations.

Following questions had to be answered:

1. How practical is the procedure in question?
2. How high is the quality of the products?

Therefore, one RBC and one PC were taken from 20 donors. The statutory guidelines were adhered to. However, in addition, other parameters were implemented to verify the obtained quality.

The RBCs were stored for 49 days; the PCs were stored for 5 days.

## Material and Method

n = 20 donors donated one RBC and one PC sample in a discontinuous donation procedure respecting the original full blood volume of the donor and his relevant blood values, whereby the guidelines of the German Medical Association (GMA) [in German: “Bundesärztekammer”, BÄK] regarding the admission of persons to apheresis and full blood donation were applied as criteria.

Afterwards, a supplementary solution of HCT (58% $\pm$  3.35) was added, followed by a storage period of the RBCs for 49 days at a temperature of 4°C.

The content of the PCs was  $1.12 \cdot 10^9$ /l platelets per PCs  $\pm$  264.92. The platelets were stored for 5 days at room temperature on a cell agitator.

There were inspections of the PCs on days 0, 3 and 5; the RBCs were monitored on days 0, 10, 20, 30, 40 and 50.

The statistics were generated with the F-Test for multiple average values and presented in table form and box plot graphics. The assumed level of significance was  $p = 0.05$ , because in this study the normal values of Gauß did not apply.

Significantly higher values of thrombocytes/RBC, free Hb, hemolysis, free potassium, viscosity, pH and the complement system were found.

The results of blood - ATP, Hb - ATP, Collagen-induced thrombocytes, ADP-induced thrombocytes, ADP- und Suprarenin-induced thrombocytes and the platelet factor 4 were significantly lower.

## Results

The products were leucocyte depleted, no complement activating function of platelets was found.

Equally, all values were within the limits demanded by the GMA, or they were higher than the minimum value. Only the pH-value of the PCs was beyond the required limits at  $7.46 \pm 0.09$ .

The time needed for the procedure of separating blood cells, however, was very long:  $108 \pm 3$  minutes.

## Conclusion

This procedure helped produce high quality products which covered the demand for RBCs and PCs. The foremost advantage of the procedure is the lower number of different donors and of procedures executed, because RBCs and PCs can be taken from one donor at the same time. This significantly reduces the risk of transferring blood-relevant germs, because a patient can receive RBC and PC from the same donor.

Specialized hospitals, especially those affiliated with universities, normally must buy 50-70% of their products. Therefore, this procedure is advantageous for them, because they usually produce twice the amount of PCs to fulfil the demand, and this procedure will allow them longer storage of the PCs.

Additionally, the virus security check of blood products will only need to be performed once. Because of the extreme binding of staff and the high set prices, this procedure will be used especially by university hospitals with a high demand for blood products, especially for



particular groups of patients (pediatry/immuno-suppressed people). Thus, the level of production can be closer to the demand.

Donors can give blood more often, depending on the collected product (RBCs can be donated less often than thrombocytes, because the regeneration of thrombocytes in vivo is fast.)

Therefore, through the implementation of different production methods, the number of regular donors needed to fulfil the demand for blood products will be less than before.

## 2. Einleitung

Mit der Entdeckung der Blutgruppen 1900 durch Karl Landsteiner (1868-1943) begonnen, hat sich das Blutspendewesen seit 1950 zu einem eigenständigen Fachgebiet entwickelt.

Die ersten Bluttransfusionen waren Direkttransfusionen, bei denen Spender- und Empfängerkreislauf durch eine Verbindung unmittelbar verbunden waren.

In den 60er Jahren kamen Flaschen, anschließend Beutel.

Erfahrungen und Kenntnisse haben zu einer Ausweitung der Einsatzmöglichkeiten geführt.

Mit dem Aphareseverfahren wurden bisher entweder Plasma, Erythrozytenkonzentrate oder Thrombozytenkonzentrate hergestellt.

Mit der Multikomponentenspende werden von einem Spender Erythrozytenkonzentrat und Thrombozytenkonzentrat gleichzeitig gewonnen.

Auch hier gibt es wieder das Bestreben durch modernere, ausgefeiltere Technik für Gewinnung, Lagerung und Anwendung der Produkte die Kosten niedrig und gleichzeitig die Qualität und Sicherheit hoch zu halten. Zellseparatoren wurden entwickelt, die, unterstützt durch ein Computerprogramm, die Qualität der gewonnenen Produkte so standardisieren und optimieren.

Blutprodukte sind in Deutschland Arzneimittel, deren Herstellung gesetzlichen Vorgaben unterliegt. (AMG = Arzneimittelgesetz, TFG = Transfusionsgesetz, PharmBetr = Pharmabetriebsverordnungsrichtlinien)

Das untersuchte Spendeverfahren ist eine „Multikomponentenspende“, mit der von einem einzigen Spender sowohl ein Thrombozytenkonzentrat als auch ein Erythrozytenkonzentrat gewonnen werden kann.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie ist die Praktikabilität des Verfahrens?
2. Wie ist die Qualität der hergestellten Produkte?

### 3. Material und Methodik

#### 3.1 Allgemeine Spenderauswahl

nach einer Validierungsphase der Mutlitkomponentenspende und Aphareseprozedur im ersten Quartal 2002 folgte dann die Untersuchungsperiode.

Bei n= 20 Spendern im Alter von 21 bis 62 Jahren wurde im Zeitraum vom 04. März bis 22. März 2002 im Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin/Blutspendedienst der Universitätskliniken Homburg/Saar eine Multikomponentenspende mit der der MCS+7Haemonetics durchgeführt.

Bei Prüfung der Spendetauglichkeit wendeten wir die Kriterien und Anforderungen der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutprodukten (Hämotherapie) (1) an.

#### Anforderungen / Kriterien (1)

Hämoglobin und/oder Hämatokrit im Spenderblut:	Frauen: 125 g/l oder 0,38 l/l Männer: 135 g/l oder 0,40 l/l
Alter:	18 – 68 Jahre
Körpergewicht:	mindestens 50 kg
Blutdruck:	systolisch 100 – 180 mmHg diastolisch unter 100 mmHg
Frequenz:	unauffällig, Frequenz 50 – 110 / Minute
Temperaturmessung:	kein Fieber
Gesamteindruck:	keine erkennbaren Krankheitszeichen
Haut der Punktionsstelle:	frei von Läsionen

#### Hygiene

Das untersuchte Spendeverfahren ist eine „Multikomponentenspende“, mit der von einem einzigen Spender Thrombozytenkonzentrate und Erythrozytenkonzentrate gewonnen werden können.

Diese zwei verschiedenen Produkte werden schon während des Spendeverfahrens vollautomatisch in dem geschlossenen System der Separationsmaschine getrennt. So kann gewährleistet werden, dass es während der Trennung der Produkte nicht zu einer Kontamination der Produkte und auch nicht zu einer Gefährdung des medizinischen Personals

kommt. Gleichzeitig hat die vollautomatische Gewinnung den Vorteil, dass die Qualitätsschwankungen der gewonnen Produkte minimiert werden konnten, weil das Überprüfen von Produktvolumen und Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrationen während der Spende durch eine ausgefeiltes Computerprogramm überprüft und gemessen werden kann.

### **Zeit**

Zu nennen ist zum Beispiel der Zeitaufwand der einzelnen Spende, den man noch einmal unterscheiden kann in die eigentliche Spendedauer und die Vorbereitung der Maschine. Zur Vorbereitung der Maschine gehört das Installieren der kommunizierenden Sammelbeutel, das so genannte Laden, und das Eingeben der personenbezogenen Spenderdaten, wie Gewicht, Geschlecht, Alter und vorher gemessene relevante Blutwerte, damit das Programm für den jeweiligen Spender die benötigte Zyklenanzahl und die Spendezeit ermitteln kann, die notwendig sind, qualitativ hochwertige, den Richtlinien entsprechende Produkte herstellen zu können.

## **3.2. Apharesesystem**

das Haemonetics-MCS + LN09000-220E/ED leukozytendepletierte Thrombozyten und Erythrozyten -LDPRC – Protokoll

Einzelheiten des Spendeverfahrens finden sich im Anhang

### **Lagerung und Verwendung von Erythrozyten**

Die EK werden bei +4°C in Kühlräumen mit fortlaufender Temperaturregistrierung gelagert. Die Verwendbarkeit der EK ist auch mit der Additivlösung SAG-M, die eine längere Haltbarkeit ermöglicht, auf 42 Tage beschränkt.

Qualitätskriterien von leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentrate finden sich in folgender Tabelle

Präparat	Volumen (ml)	Hkt l/l	Gesamt-Hb (g; mmol)	Rest-Leukozyten	Restplasma (ml)	Hämolyse (%)
Leukozyten-Depletiertes EK	200- 350	0,50-0,70	> 40 (> 24,8 mmol)	< $1 \cdot 10^6$	< 25	< 0,8

Qualitätskriterien von leukozytendepletierten Thrombozytenkonzentraten finden sich in folgender Tabelle

Präparat	Volumen	Thrombozyten-zahl	Restleuko-zyten	Restery-throzyten	pH	visuelle Kontrolle
leukozyten-depletiertes TK	250 ml	> $60 \cdot 10^9$ / Einheit	< $0,5 \cdot 10^8$ / Einheit	< $0,5 \cdot 10^9$ / Einheit	6,5- 7,4	unversehrt

### 3.3. Labormethoden

Es wurden folgende Parameter bestimmt. Eine Übersicht findet sich in folgender Tabelle.

Einzelheiten zur Methodik finden sich im Anhang.

Übersicht der verwendeten Geräte, Reagenzien und Kits

	GERÄT	REAGENZ	KITHERSTELLER
Blutbild	Sysmex		
Erythrozytenaggregation	Myrene		
Blutviskositätsmessung	Fresenius Drei Eichen		
induzierte Thrombozytenaggregation	Wolf Greiner Biochemica GmbH Flacht		
ATP		Sigma Diagnostics	Sigma Diagnostics
PF4			Boehringer Mannheim, Diagnostika Stago
Human-Thrombin/AntithrombinIII-Komplex			Enzygnost TATmicro der Firma DADE Behring
Elastase		Diagnostica MERCK	
Anaphylatoxin C5a			AURICA DRG DIAGNOSTICS
β-Thromboglobulin			Boehringer Mannheim, Diagnostika Stago

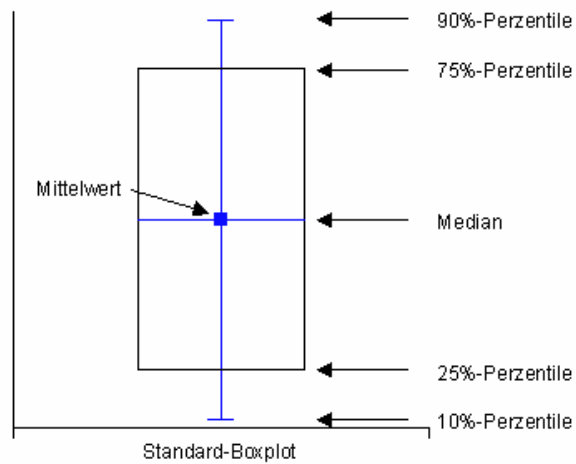
### 3.4. verwendete Statistik

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde der F - Test für multiple Mittelwerte angewendet.

Die statistische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm

Apple Mathematica Version 2.2 erstellt. Das Signifikanzniveau betrug 0,05 (5%).

Hier der Standard-Boxplot.



## 4. Ergebnisse

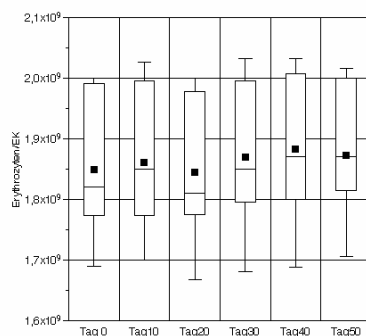
### 4.1 Gesamt-RBC/Erythrozytenkonzentrat

**Tabelle 4.1.1: Gesamt-RBC/Erythrozytenkonzentrat über den gesamten Messzeitraum**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	$1,85 \times 10^9$	$1,86 \times 10^9$	$1,84 \times 10^9$	$1,87 \times 10^9$	$1,88 \times 10^9$	$1,87 \times 10^9$
Standardabweichung	$1,25 \times 10^8$	$1,29 \times 10^8$	$1,27 \times 10^8$	$1,32 \times 10^9$	$1,36 \times 10^9$	$1,22 \times 10^8$
<b>Minimum</b>	$1,57 \times 10^9$	$1,58 \times 10^9$	$1,58 \times 10^9$	$1,61 \times 10^9$	$1,61 \times 10^9$	$1,59 \times 10^9$
Maximum	$2,01 \times 10^9$	$2,03 \times 10^9$	$2,03 \times 10^9$	$2,07 \times 10^9$	$2,05 \times 10^9$	$2,02 \times 10^9$

Die Erythrozyten/Erythrozytenkonzentrat mit einem Wert von  $1,85 \times 10^9 \pm 1,25 \times 10^8$  bleiben über den gesamten Messraum von 49 Tagen konstant, wie in Tabelle 4.1.1 und Abbildung 4.1 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.1: Gesamt-RBC/Erythrozytenkonzentrat über den gesamten Messzeitraum**



**Tabelle 4.1.2: Statistik für Gesamt-RBC/Erythrozytenkonzentrat über den gesamten Messraum**

<b>Multip-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	0,347486
<b>F-Grenzwert</b>	2,29843
Kein signifikanter Unterschied	



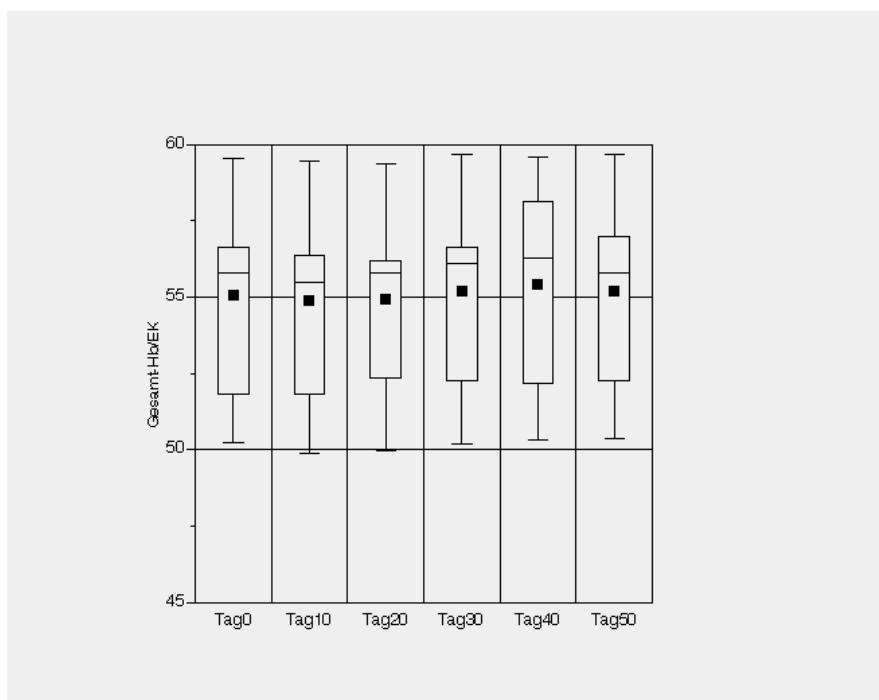
## 4.2 Gesamthämoglobin/Erythrozytenkonzentrat

**Tabelle 4.2.1: Gesamt - Hämoglobin über den gesamten Messraum in [g]**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	55,04	54,86	54,92	55,17	55,41	55,18
<b>Standardabweichung</b>	3,73	3,65	3,53	3,71	3,67	3,57
<b>Minimum</b>	46,78	47,07	47,36	47,07	47,36	47,07
<b>Maximum</b>	61,77	61,49	60,93	61,49	60,93	60,93

Das Gesamthämoglobin bleibt mit einem Wert von 55,04 g +/- 3,73 an Tag 0 über den gesamten Messraum von 49 Tagen konstant, wie in Tabelle 4.2.1 und Abbildung 4.2 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.2: Gesamt - Hämoglobin über den gesamten Messraum in [g]**



**Tabelle 4.2.2: Statistik für Gesamt-Hb über den gesamten Messraum**

<b>Multi-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	0,0558494
<b>F-Grenzwert</b>	2,29843
Kein signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich des Gesamt - Hb im Verlauf der Lagedauer keinen signifikanten Unterschied nachweisen.

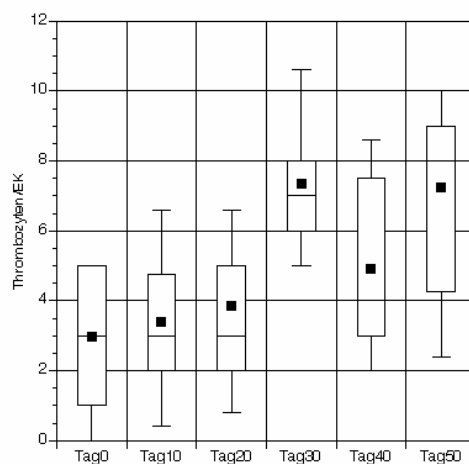
### 4.3 Thrombozyten/Erythrozytenkonzentrat

**Tabelle 4.3.1: Thrombozyten/Erythrozytenkonzentrat über den gesamten Messraum in  $[10^3/\mu\text{l}]$**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	2,95	3,37	3,84	7,32	4,89	7,21
<b>Standardabweichung</b>	2,12	2,17	3,27	2,00	2,87	3,24
<b>Minimum</b>	0,00	0,00	0,00	4,00	2,00	2,00
<b>Maximum</b>	7,00	8,00	15,0	11,0	12,0	14,0

Die Thrombozyten/Erythrozytenkonzentrat nehmen über den gesamten Messraum von 49 Tagen zu, wie in Tabelle 4.3.1 und Abbildung 4.3 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.3: Thrombozyten/Erythrozytenkonzentrat über den gesamten Messraum in  $[10^3/\mu\text{l}]$**



**Tabelle 4.3.2: Statistik für Thrombozyten/Erythrozytenkonzentrat**

<b>Multip-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	9,92285
<b>F-Grenzwert</b>	2,29843
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich der Thrombozyten im Erythrozytenkonzentrat im Verlauf der Lagedauer einen signifikanten Anstieg nachweisen

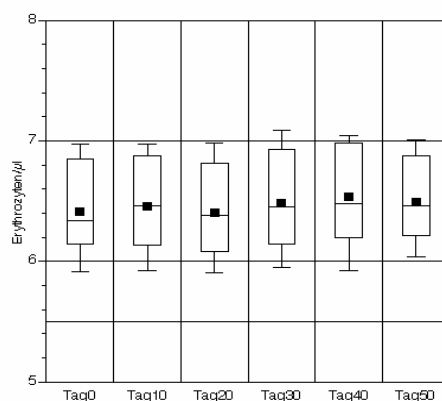
#### 4.4 Erythrozyten/ $\mu\text{l}$

**Tabelle 4.4.1: Erythrozyten in [ $\mu\text{l}$ ] über den gesamten Messraum**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	6,41	6,44	6,40	6,48	6,53	6,49
<b>Standardabweichung</b>	0,44	0,45	0,43	0,45	0,47	0,42
<b>Minimum</b>	5,41	5,44	5,45	5,54	5,53	5,46
<b>Maximum</b>	7,04	7,18	7,00	7,09	7,10	7,14

Die Erythrozytenzahl/ $\mu\text{l}$  bleibt mit einem Wert von  $6,41 \cdot 10^6$  / $\mu\text{l}$  an Tag 0  $6,49/\mu\text{l}$  über den gesamten Messraum von 49 Tagen konstant, wie in Tabelle 4.4.1 und Abbildung 4.4 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.4: Erythrozyten in [ $\cdot 10^6/\mu\text{l}$ ] über den gesamten Messraum**



**Tabelle 4.4.2: Statistik für Erythrozyten/ $\mu\text{l}$**

<b>Multi-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	0,347486
<b>F-Grenzwert</b>	2,29843
Kein signifikanter Unterschied	

Der F- Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich der Erythrozyten/ $\mu\text{l}$  im Verlauf der Lagedauer keinen signifikanten Unterschied nachweisen

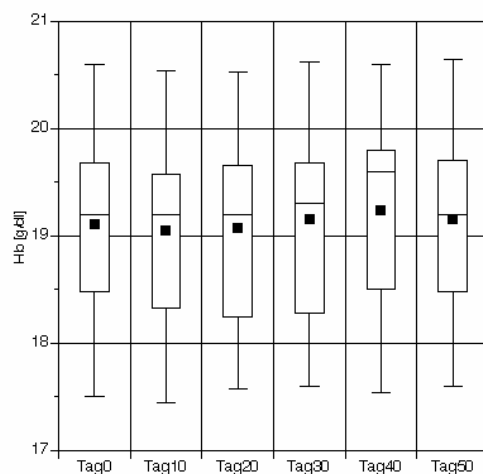
#### 4.5 Hämoglobin über den gesamten Messraum

**Tabelle 4.5.1: Hämoglobin über den gesamten Messraum in [g/dl]**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	19,11	19,04	19,06	19,15	19,23	19,15
<b>Standardabweichung</b>	1,28	1,26	1,20	1,25	1,24	1,22
<b>Minimum</b>	16,10	16,20	16,30	16,20	16,30	16,20
<b>Maximum</b>	21,90	21,80	21,60	21,80	21,60	21,60

Das Hämoglobin bleibt mit einem Wert von 19,11+/- 1,28 g/dl an Tag 1 über den gesamten Messraum von 49 Tagen konstant, wie aus Tabelle 4.5.1 und Abbildung 4.5 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.5: Hämoglobin über den gesamten Messraum in [g/dl]**



**Tabelle 4.5.2: Statistik für Hämoglobin**

<b>Multi-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	0,0558494
<b>F-Grenzwert</b>	2,29843
Kein signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich des Hämoglobins im Erythrozytenkonzentrat im Verlauf der Lagedauer keinen signifikanten Unterschied nachweisen.

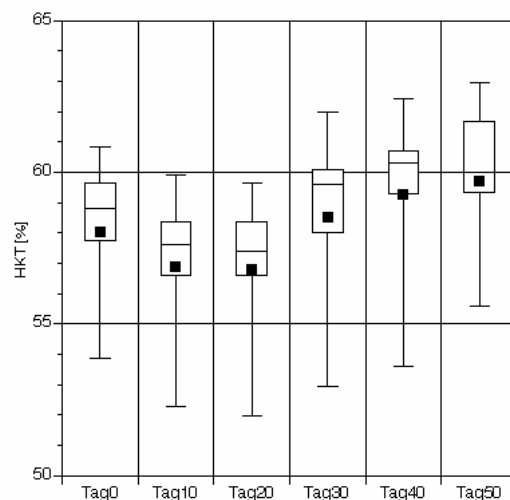
## 4.6 Hämatokrit

**Tabelle 4.6.1: Hämatokrit über den gesamten Messraum in [%]**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	58,0	56,87	56,76	58,52	59,24	59,71
<b>Standardabweichung</b>	3,35	3,57	3,45	3,81	3,84	3,65
<b>Minimum</b>	47,00	45,90	46,20	47,50	47,80	48,60
<b>Maximum</b>	62,40	62,90	62,20	64,80	65,30	66,70

Das Hb nimmt über den gesamten Messraum von 49 Tagen zu, wie aus Tabelle 4.6.1 und Abbildung 4.6 ersichtlich ist, jedoch konnte kein signifikanter Anstieg gemessen werden.

**Abbildung 4.6: Hämatokrit über den gesamten Messraum in [%]**



**Tabelle 4.6.2: Statsitk für Hämatokrit**

<b>Multi-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	2,12241
<b>F-Grenzwert</b>	2,29843
Kein signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich des Hämatokrits im Erythrozytenkonzentrat im Verlauf der Lagedauer keinen signifikanten Unterschied nachweisen.

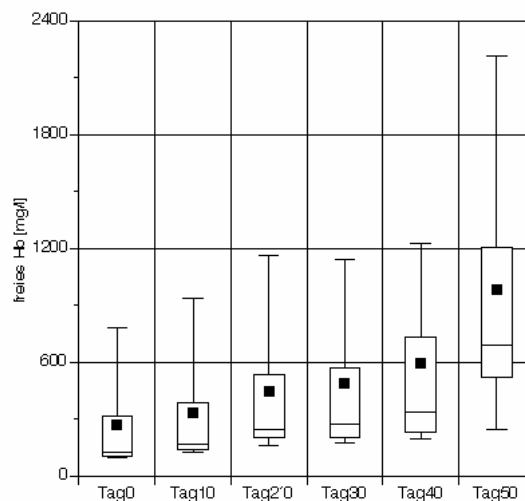
## 4.7 Freies Hämoglobin

**Tabelle 4.7.1: Freies Hämoglobin über den gesamten Messraum in [mg/l]**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	266,89	328,21	444,84	486,63	593,26	978,74
<b>Standardabweichung</b>	294,55	320,80	452,58	544,45	608,40	791,09
<b>Minimum</b>	55,00	80,00	132,00	137,00	136,00	166,00
<b>Maximum</b>	1055,00	1089,00	1818,00	2355,00	2701,00	3088,00

Das freie Hämoglobin nimmt über den gesamten Messraum von 49 Tagen signifikant zu, wie in Tabelle 4.7.1 und Abbildung 4.7 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.7: freies Hämoglobin über den gesamten Messraum in [mg/l]**



**Tabelle 4.7.2: Statistik für freies Hämoglobin**

<b>Multip-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	4,3702
<b>F-Grenzwert</b>	2,29843
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte hat hinsichtlich des freien Hämoglobins im Erythrozytenkonzentrat im Verlauf der Lagedauer einen signifikanten Unterschied nachgewiesen

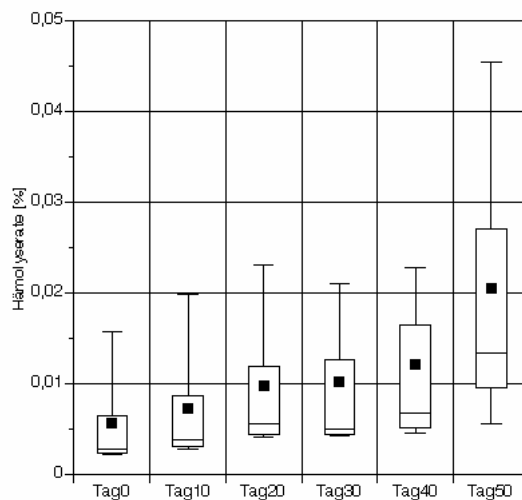
## 4.8 Hämolyserate

**Tabelle 4.8.1: Hämolyserate über den gesamten Messraum in [%]**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	0,0055	0,0071	0,0096	0,01	0,01	0,02
<b>Standardabweichung</b>	0,0056	0,0066	0,0062	0,01	0,01	0,02
<b>Minimum</b>	0,0018	0,0027	0,0040	0,00	0,00	0,01
<b>Maximum</b>	0,0197	0,0209	0,0384	0,05	0,05	0,07

Die Hämolyserate steigt während des gesamten Messraums signifikant an, wie in Tabelle 4.8.1 und Abbildung 4.8 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.8: Hämolyserate über den gesamten Messraum in [%]**



**Tabelle 4.8.2 Statistik für Hämolyserate über den gesamten Messraum**

<b>Multip-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	4,29786
<b>F-Grenzwert</b>	2,29843
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich der Hämolyserate im Verlauf der Lagedauer einen signifikanten Anstieg nachweisen.

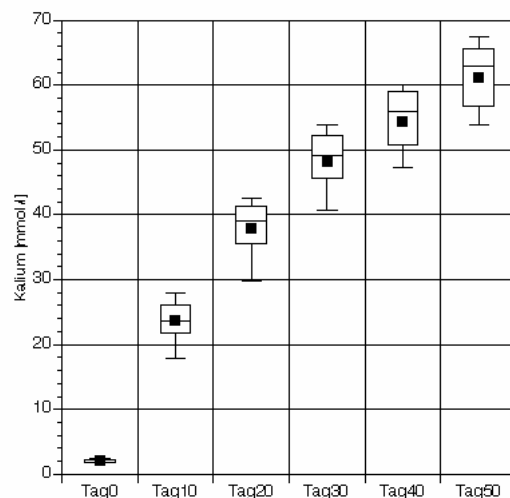
## 4.9 Freies Kalium

**Tabelle 4.9.1: Kalium über den gesamten Messraum in [mmol/l]**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	2,10	23,61	37,75	48,14	54,34	61,00
<b>Standardabweichung</b>	0,26	3,86	4,90	5,42	5,82	6,35
<b>Minimum</b>	1,70	15,6	26,70	34,30	38,00	42,50
<b>Maximum</b>	2,50	31,6	45,40	55,90	60,70	68,80

Das Kalium steigt im gesamten Messraum signifikant an, wie in Tabelle 4.9.1 und Abbildung 4.9 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.9: Kalium über den gesamten Messraum in [mmol/l]**



**Tabelle 4.9.2: Statistik für Kalium über den gesamten Messraum**

<b>Multi-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	383,124
<b>F-Grenzwert</b>	2,29843
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich des Kaliums über den gesamten Messraum einen signifikanten Anstieg nachweisen.



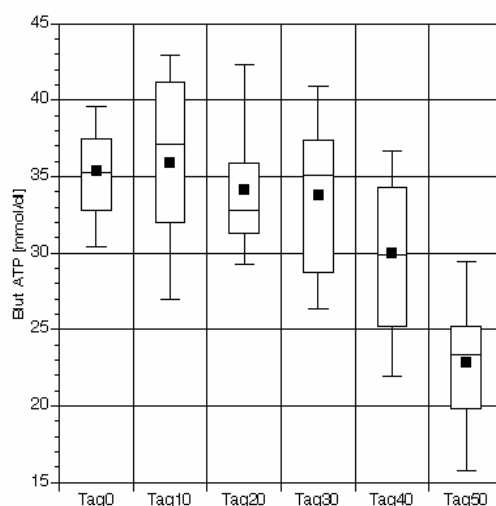
#### 4.10 Blut-ATP

**Tabelle 4.10.1: Blut-ATP über den gesamten Messraum in [mmol/dl]**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	35,35	35,85	34,14	33,73	30,02	22,87
<b>Standardabweichung</b>	3,79	5,96	4,43	5,65	5,50	4,66
<b>Minimum</b>	28,10	24,40	28,50	24,10	21,70	14,70
<b>Maximum</b>	43,60	45,60	44,60	43,10	39,90	32,00

Der Blut-ATP-Gehalt nahm über den gesamten Messraum signifikant ab, wie in Tabelle 4.10.1 und Abbildung 4.10 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.10: Blut-ATP über den gesamten Messraum in [mmol/dl]**



**Tabelle 4.10.2: Statistik für Blut-ATP über den gesamten Messraum**

<b>Multipl-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	69,4517
<b>F-Grenzwert</b>	2,3186
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich des Blut-ATP im Verlauf der Lagedauer einen signifikanten Abfall nachweisen.

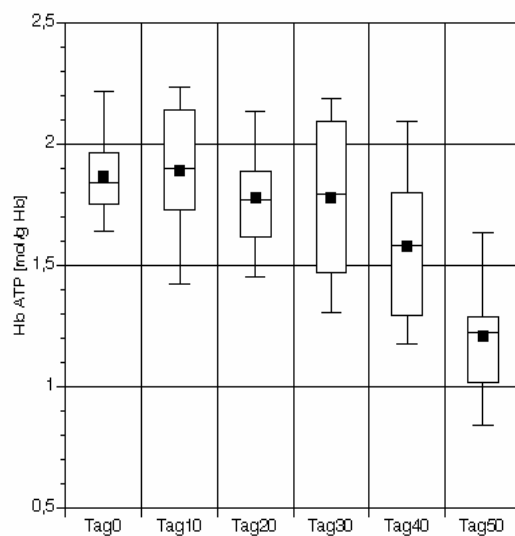
## 4.11 Hämoglobin-ATP

**Tabelle 4.11.1: Hämoglobin-ATP über den gesamten Messraum in [mol/g Hb]**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	1,86	1,89	1,77	1,77	1,57	1,20
<b>Standardabweichung</b>	0,21	0,30	0,25	0,35	0,33	0,28
<b>Minimum</b>	1,48	1,25	1,43	1,16	1,01	0,71
<b>Maximum</b>	2,27	2,27	2,22	2,25	2,12	1,84

Das Hämoglobin-ATP fällt über den gesamten Messraum signifikant ab, wie aus Tabelle 4.11.1 und Abbildung 4.11 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.11: Hämoglobin-ATP über den gesamten Messraum in [mol/g Hb]**



**Tabelle 4.11.2: Statistik für Hämoglobin-ATP über den gesamten Messraum**

<b>Multi-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	777,331
<b>F-Grenzwert</b>	2,31686
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich des Hämoglobin-ATP einen signifikanten Abfall nachweisen.

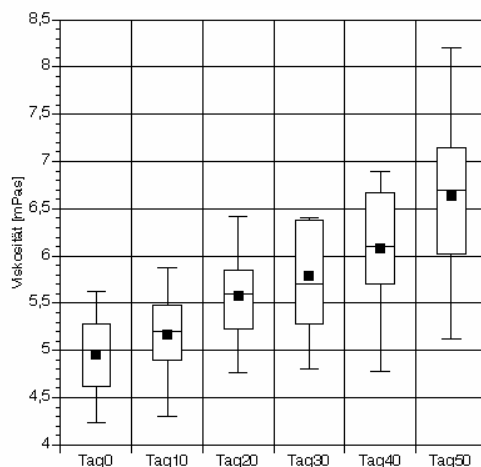
## 4.12 Viskosität

**Tabelle 4.12.1: Viskosität über den gesamten Messraum in [mPas]**

	Tag 0	Tag 10	Tag 20	Tag 30	Tag 40	Tag 50
<b>Mittelwert</b>	4,95	5,16	5,57	5,78	6,08	6,63
<b>Standardabweichung</b>	0,65	0,69	0,73	0,83	0,92	1,10
<b>Minimum</b>	3,60	3,80	4,10	4,30	4,20	4,30
<b>Maximum</b>	6,60	7,00	7,50	7,70	8,30	8,80

Die Viskosität nimmt im gesamten Messraum von 49 Tagen zu, wie in Tabelle 4.12.1 und Abbildung 4.12 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.12: Viskosität über den gesamten Messraum in [mPas]**



**Tabelle 4.12.2: Statistik für Viskosität über den gesamten Messraum**

<b>Multip-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	10,5838
<b>F-Grenzwert</b>	2,29843
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich der Viskosität im Verlauf der Lagedauer einen signifikanten Anstieg nachweisen.

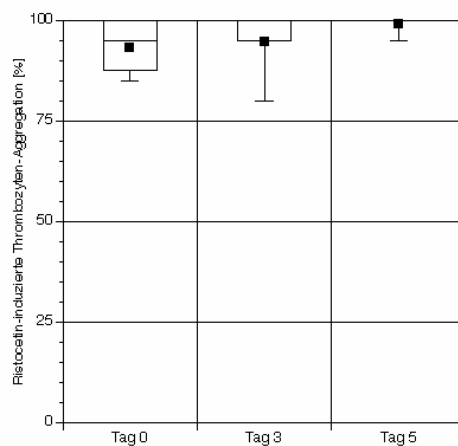
### 4.13 Ristocetin-induzierte Thrombozyten

**Tabelle 4.13.1: Ristocetin-induzierte Thrombozyten über den gesamten Zeitraum in [%]**

	Tag 0	Tag 3	Tag 5
<b>Mittelwert</b>	98,75	94,5	93,75
<b>Standardabweichung</b>	4,55	6,86	10,99
<b>Minimum</b>	80	80	55
<b>Maximum</b>	100	100	100

Die Ristocetin-induzierten Thrombozyten mit einem Wert von 98,75% +/- 4,55 an Tag 0 bleiben über den gesamten Messraum von 5 Tagen konstant.

**Abbildung 4.13: Ristocetin-induzierte Thrombozyten über den gesamten Zeitraum in [%]**



**Tabelle 4.13.2: Statistik für Ristocetin-induzierte Thrombozyten**

<b>Multi-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	2,31368
<b>F-Grenzwert</b>	3,15884
Kein signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich der Ristocetin-induzierten Thrombozyten im Verlauf der Lagedauer keinen signifikanten Unterschied nachweisen.

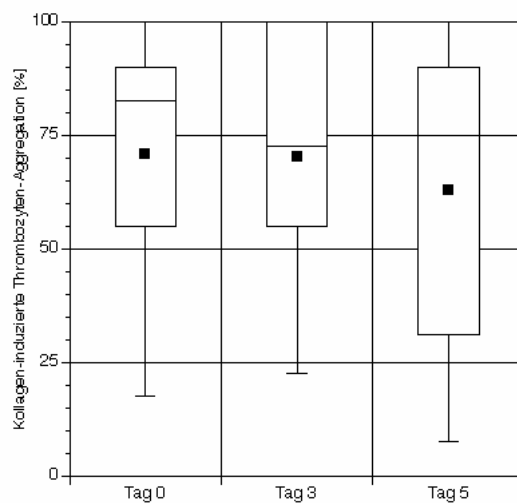
#### 4.14 Kollagen-induzierte Thrombozyten

**Tabelle 4.14.1: Kollagen-induzierte Thrombozyten über den gesamten Messraum in [%]**

	Tag 0	Tag 3	Tag 5
<b>Mittelwert</b>	92,25	64,95	46,60
<b>Standardabweichung</b>	11,41	31,39	28,62
<b>Minimum</b>	60	0	0
<b>Maximum</b>	100	100	100

Die Prozentzahl der Kollagen-induzierten Thrombozyten nahm über den gesamten Messraum signifikant ab.

**Abbildung 4.14: Kollagen-induzierte Thrombozyten über den gesamten Messraum in [%]**



**Tabelle 4.14.2: Statistik für Kollagen-induzierte Thrombozyten**

<b>Multi-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	16,3639
<b>F-Grenzwert</b>	3,15884
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich der Kollagen-induzierten Thrombozyten einen signifikanten Abfall im Verlauf der Lagedauer nachweisen.

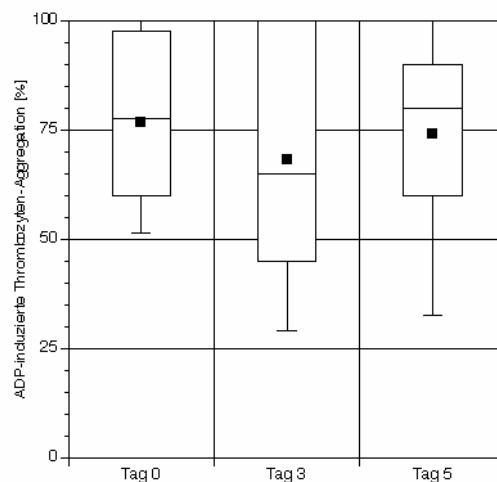
#### 4.15 ADP-induzierte Thrombozyten

**Tabelle 4.15.1: ADP-induzierte Thrombozyten über den gesamten Messraum in [%]**

	<b>Tag 0</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 5</b>
<b>Mittelwert</b>	95,50	63,90	59,40
<b>Standardabweichung</b>	7,24	19,45	22,37
<b>Minimum</b>	80	30	20
<b>Maximum</b>	100	100	95

Die Prozentzahl der ADP-induzierten Thrombozyten nahm über den gesamten Messraum signifikant ab, wie aus Tabelle 4.15.1 und Abbildung 4.15 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.15: ADP-induzierte Thrombozyten über den gesamten Messraum in [%]**



**Tabelle 4.15.2: Statistik für ADP-induzierte Thrombozyten**

<b>Multip-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	24,9403
<b>F-Grenzwert</b>	3,15884
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich der ADP-induzierten Thrombozyten einen signifikanten Abfall nachweisen.

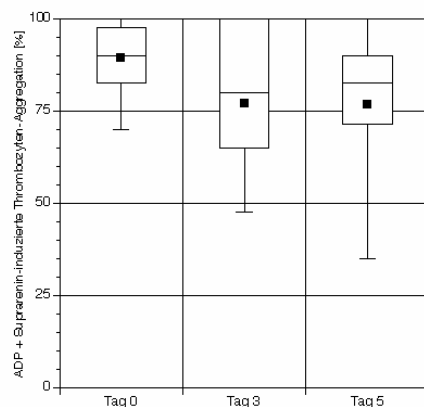
#### 4.16 ADP- und Suprarenin-induzierte Thrombozyten

**Tabelle 4.16.1: ADP- und Suprarenin-induzierte Thrombozyten über den gesamten Messraum in [%]**

	Tag 0	Tag 3	Tag 5
<b>Mittelwert</b>	94,75	72,75	75,40
<b>Standardabweichung</b>	6,78	25,98	14,22
<b>Minimum</b>	80	0	20
<b>Maximum</b>	100	100	100

Die Prozentzahl der ADP- und Suprarenin-induzierten Thrombozyten fiel über den gesamten Messraum signifikant ab.

**Abbildung 4.16: ADP- und Suprarenin-induzierte Thrombozyten über den gesamten Messraum in [%]**



**Tabelle 4.16.2: Statistik für ADP- und Suprarenin-induzierte Thrombozyten**

<b>Multi-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	7,93668
<b>F-Grenzwert</b>	3,15884
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich der ADP- und Suprarenin-induzierten Thrombozyten einen signifikanten Abfall nachweisen.

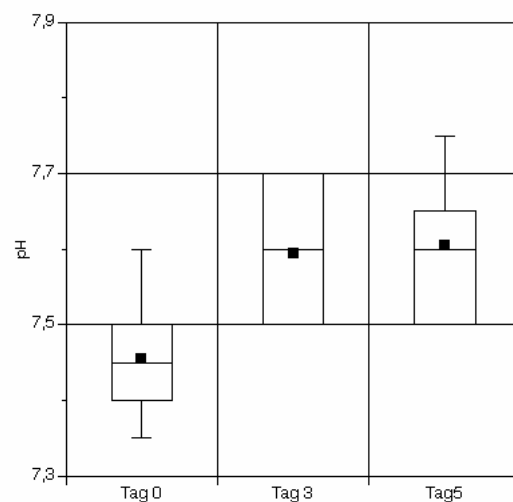
#### 4.17 pH-Wert der Thrombozyten

**Tabelle 4.17.1: pH der Thrombozytenkonzentrate über den gesamten Messraum**

	<b>Tag 0</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 5</b>
<b>Mittelwert</b>	7,46	7,6	7,6
<b>Standardabweichung</b>	0,09	0,09	0,11
<b>Minimum</b>	7,3	7,4	7,4
<b>Maximum</b>	7,6	7,7	7,9

Der pH-Wert stieg über den gesamten Messraum signifikant an, wie aus Tabelle 4.17.1 und Abbildung 4.17 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.17: pH der Thrombozytenkonzentrate über den gesamten Messraum**



**Tabelle 4.17.2: Statistik für pH-Wert**

<b>Multip-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	14,618
<b>F-Grenzwert</b>	3,15884
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich des pH-Wertes einen signifikanten Anstieg nachweisen.



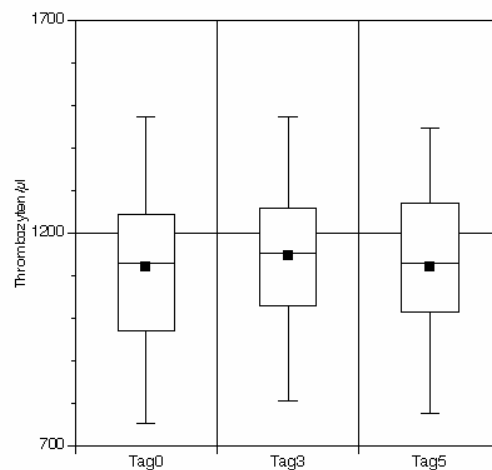
## 4.18 Thrombozyten

**Tabelle 4.18.1: Thrombozyten über den gesamten Messraum in [ $\mu\text{l}^{-1}$ ]**

	Tag 0	Tag 3	Tag 5
<b>Mittelwert</b>	1121,05	1147,55	1120,90
<b>Standardabweichung</b>	264,92	261,68	245,98
<b>Minimum</b>	570	590	584
<b>Maximum</b>	1688	1746	1574

Die Thrombozytenzahl blieb mit einem Anfangswert von  $1121,05/\mu\text{l} \pm 264,92$  über den gesamten Messraum von 5 Tagen konstant, wie aus Tabelle 4.18.1 und Abbildung 4.18 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.18: Thrombozyten über den gesamten Messraum in [ $\mu\text{l}^{-1}$ ]**



**Tabelle 4.18.2: Statistik für Thrombozyten**

<b>Multip-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	0,0709218
<b>F-Grenzwert</b>	3,15884
Kein signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich der Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  über den gesamten Messraum keinen signifikanten Unterschied nachweisen.

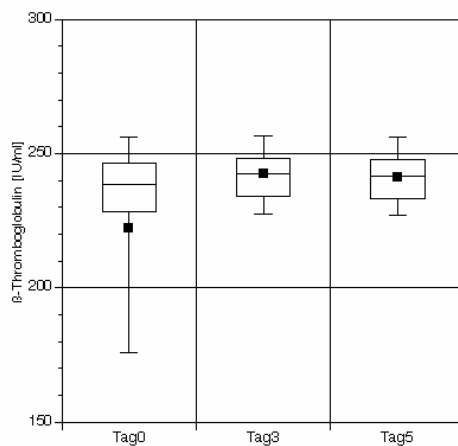
#### 4. 19 $\beta$ -Thromboglobulin

**Tabelle 4.19.1:  $\beta$ -Thromboglobulin über den gesamten Messraum in [IU/ $\mu$ l]**

	Tag 0	Tag 3	Tag 5
<b>Mittelwert</b>	241,88	242,55	243,31
<b>Standardabweichung</b>	12,83	11,43	10,29
<b>Minimum</b>	219,012	224,973	226,804
<b>Maximum</b>	267,821	269,746	260,746

Das  $\beta$ -Thromboglobulin blieb mit einem Anfangswert von 241,88 IU/ $\mu$ l +/- 12,83 über den gesamten Messraum von 5 Tagen konstant, wie aus Tabelle 4.19.1 und Abbildung 4.19 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.19:  $\beta$ -Thromboglobulin über den gesamten Messraum in [IU/ $\mu$ l]**



**Tabelle 4.19.2: Statistik für  $\beta$ -Thromboglobulin**

<b>Multi-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	0,0025739
<b>F-Grenzwert</b>	3,18261
Kein signifikanter Unterschied	

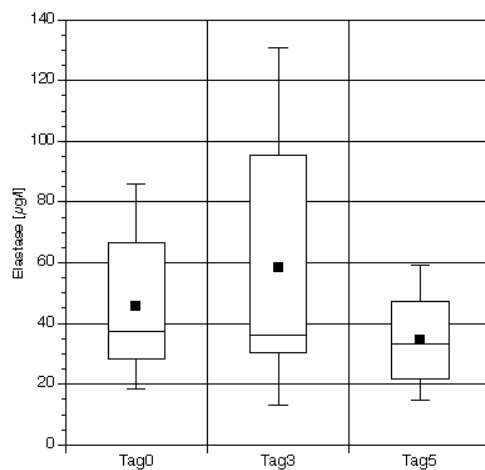
Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich des  $\beta$ -Thromboglobulin über den gesamten Messraum keinen signifikanten Unterschied nachweisen.

## 4.20 Elastase

**Tabelle 4.20.1: Elastase über den gesamten Messraum in [µg/l]**

	<b>Tag 0</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 5</b>
<b>Mittelwert</b>	45,7	58,4	34,7
<b>Standardabweichung</b>	27,1	48,5	18,1
<b>Minimum</b>	1,50	2,40	2,10
<b>Maximum</b>	102	186	76,4

Die Elastase blieb mit einem Anfangswert von 45,7 µg/l +/- 27,1 über den gesamten Messraum von 5 Tagen konstant, wie aus Tabelle 4.20.1 und Abbildung 4.20 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.20: Elastase über den gesamten Messraum in [µg/l]****Tabelle 4.20.2: Statistik für Elastase**

<b>Multip-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	2,47237
<b>F-Grenzwert</b>	3,15884
Kein signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich der Elastase über den gesamten Messraum keinen signifikanten Unterschied nachweisen.

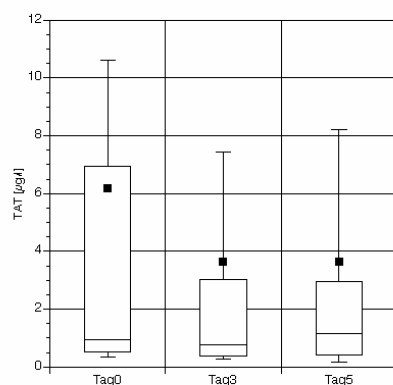
#### 4.21 Thromboglobulin-Anti-Thromboglobulin

**Tabelle 4.21.1: Thromboglobulin-Anti-Thromboglobulin über den gesamten Messraum in  $[\mu\text{g/l}]$**

	Tag 0	Tag 3	Tag 5
<b>Mittelwert</b>	6,18	3,64	3,63
<b>Standardabweichung</b>	13,5	8,10	7,42
<b>Minimum</b>	25,2	6,10	6,80
<b>Maximum</b>	58,3	3,65	3,32

Die Thromboglobulin–Anti-Thromboglobulin-Werte fielen über den gesamten Messraum ab, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, wie aus Tabellen 4.21.1 und 4.21.2 sowie der Abbildung 4.21 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.21: Thromboglobulin–Anti-Thromboglobulin über den gesamten Messraum in  $[\mu\text{g/l}]$**



**Tabelle 4.21.2: Statistik für Thromboglobulin-Anti-Thromboglobulin**

<b>Multip-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	0,41004
<b>F-Grenzwert</b>	3,16499
Kein signifikanter Unterschied	

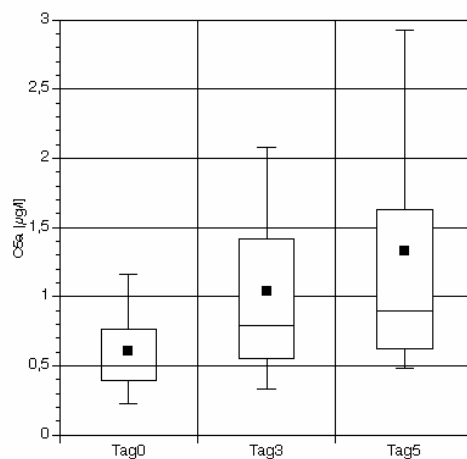
Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich des Thromboglobulin–Anti-Thromboglobulin über den gesamten Messraum keinen signifikanten Unterschied nachweisen.

## 4.22 C5a

**Tabelle 4.22.1: C5a über den gesamten Messraum in [g/l]**

	<b>Tag 0</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 5</b>
<b>Mittelwert</b>	0,610	1,040	1,33
<b>Standardabweichung</b>	0,370	0,784	1,06
<b>Minimum</b>	0,173	0,037	3,11
<b>Maximum</b>	1,600	3,270	4,41

Die Konzentration des C5a stieg über den gesamten Messraum an von durchschnittlich 0,61 g/l an Tag0 auf 1,33 g/l an Tag5, wie aus Tabelle 4.22.1 und Abbildung 4.22 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.22: C5a über den gesamten Messraum in [g/l]****Tabelle 4.22.2: Statistik für C5a**

<b>Multip-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	3,86803
<b>F-Grenzwert</b>	3,16499
signifikanter Unterschied	

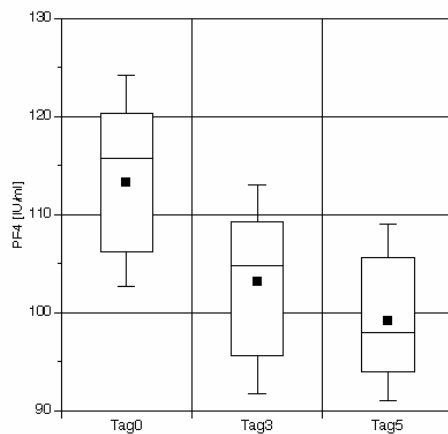
Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte für die Konzentration des C5a über den gesamten Messraum einen signifikanten Anstieg nachweisen.

## 4.23 PF4

**Tabelle 4.23.1: PF4 über den gesamten Messraum in [IU/μl]**

	<b>Tag 0</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 5</b>
<b>Mittelwert</b>	113	103,15	99,1
<b>Standardabweichung</b>	10,2	8,35	6,97
<b>Minimum</b>	91,3	88,382	86,168
<b>Maximum</b>	131	116,264	111,455

Die Konzentration des PF4 sank über den gesamten Messraum von 5 Tagen ab von initial durchschnittlich 113 IU/μl auf 99,1 IU/μl im Mittel an Tag 5 ab, wie aus Tabelle 4.23.1 und Abbildung 4.23 ersichtlich ist.

**Abbildung 4.23: PF4 über den gesamten Messraum in [IU/μl]****Tabelle 4.23.2: Statistik für PF4**

<b>Multi-F-Test</b>	
<b>F-Wert</b>	11,6232
<b>F-Grenzwert</b>	3,18261
signifikanter Unterschied	

Der F-Test für multiple Mittelwerte konnte hinsichtlich des PF4 einen signifikanten Abfall nachweisen.

## Zusammenfassen der Ergebnisse

	Tag 1	Ende der Haltbarkeit	Unterschied
<b>Thrombozyten/ Erythrozytenkonzentrat</b>	<b>2,95+/-2,12*10<sup>3</sup>/µl</b>	<b>7,21+/-3,24*10<sup>3</sup>/µl</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>freies Hämoglobin</b>	<b>266,89+/-294,55 mg/l</b>	<b>978,74+/-791,09 mg/l</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>Hämolyserate</b>	<b>0,0055+/- 0,0056%</b>	<b>0,02+/-0,02%</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>freies Kalium</b>	<b>2,10+/-0,26 mmol/l</b>	<b>61,00+/-6,35 mmol/l</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>Blut-ATP</b>	<b>35,35+/-3,79 mmol/dl</b>	<b>22,87+/-4,66 mmol/dl</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>Hämoglobin-ATP</b>	<b>1,86+/-0,21 mol/g Hb</b>	<b>1,20+/-0,28 mol/g Hb</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>Viskosität</b>	<b>4,95+/-0,65 mPas</b>	<b>6,63+/-1,10 mPas</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>Kollagen induzierte Thrombozyten</b>	<b>92,25+/-11,41 %</b>	<b>46,60+/-28,62 %</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>ADP induzierte Thrombozyten</b>	<b>95,5+/-7,24 %</b>	<b>59,40+/-22,37 %</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>ADP und Suprarenin induzierte Thrombozyten</b>	<b>94,75+/-6,78 %</b>	<b>75,40+/-14,22 %</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>pH- Wert der Thrombozyten</b>	<b>7,46+/-0,09</b>	<b>7,6+/-0,11</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>Komplementsystem</b>	<b>0,610+/-0,370 g/l</b>	<b>1,33+/-1,06 g/l</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
<b>PF 4</b>	<b>113+/- 10,2 IU/µl</b>	<b>99,1+/-6,97 IU/µl</b>	<b>signifikant (p= 0,05)</b>
Gesamt-RBC/EK	1,85+/-0,125*10 <sup>9</sup>	1,87+/-0,122*10 <sup>9</sup>	nicht signifikant
Erythrozyten/ µl	6,41+/-0,44	6,49+/-0,42	nicht signifikant
Hämoglobin in [ g/dl]	19,11+/-1,28	19,15+/-1,22	nicht signifikant
Hämatokrit in [ % ]	58,0+/- 3,35	59,71+/-3,65	nicht signifikant
Ristocetin-induzierte Thrombozyten in [ % ]	98,75+/-4,55	93,75+/-10,99	nicht signifikant
Thrombozyten in [ / µl]	1121,05+/-264,92	1120,90+/-245,98	nicht signifikant
β-Thromboglobulin in [IU/µl]	241,88+/-12,83	243,31+/-10,29	nicht signifikant
Proteolyse in [µg/l]	45,7+/-27,1	34,7+/-18,1	nicht signifikant
plasmatische Gerinnungsaktivierung in [µg/l]	6,18+/-13,5	3,63+/-7,42	nicht signifikant
Komplementsystem in [g/l]	0,610+/-0,370	1,33+/-1,06	nicht signifikant

## 5. Diskussion

Bei der ersten Herstellung von Blutprodukten war die Variabilität der Produkte sehr hoch.

Routinemäßige Qualitätskontrollen waren nicht vorgeschrieben und erfolgten nicht.

Seit Blutprodukte im Rahmen der Virussicherheitsprobleme (HIV) in Deutschland dem Arzneimittelgesetz zufallen, bedürfen sie der Zulassung. Das bedeutet, dass regelmäßige Qualitätskontrollen vorgeschrieben sind und dem Paul-Ehrlich-Institut als zuständiger Behörde vorgelegt werden müssen. Durch den Einsatz von Aphareseverfahren ist die Qualität im Gegensatz zu manuell hergestellten Erythrozytenkonzentraten keiner großen Variabilität unterworfen.

### 1. Gesamt-RBC/EK

Aufgrund individueller Einflussgrößen der Spender, der Spendezeit, des Intervalls zwischen Spende und Spendeverarbeitung ist die Qualität von Erythrozytenkonzentrat und manuell hergestelltem Thrombozytenkonzentrat nach 24 Stunden Lagerung einer großen Variabilität unterworfen.

Während Moog et al. (4) an Tag 0 Erythrozytenzahlen von  $1,92 \pm 0,13 \cdot 10^{12}$  in einem Erythrozytenkonzentrat erreichte, wiesen unsere Konzentrate Erythrozytenzahlen von  $1,85 \pm 0,125 \cdot 10^{12}$  im Erythrozytenkonzentrat auf.

In der Studie von Elfath et al.(2) wurden am Tag 0 Erythrozytenzahlen von  $2,28 \pm 0,17 \cdot 10^{12}$  erreicht.

Während der Lagerung blieben die Werte konstant, d.h. es kam zu keinem signifikanten Unterschied.

### 2. Gesamt-Hämoglobin

Der Wert für das Gesamt-Hämoglobin des gesammelten Erythrozytenkonzentrates, gemessen in g/ EK bleibt mit einem Wert von  $55,04 \pm 3,73$  g/EK an Tag 0 über den gesamten Messraum konstant. Dies spiegelt zum einen eine gute Qualität des gewonnenen Produktes als auch die gute Einhaltung der Lagerungsbestimmungen wider. Bezogen auf die von der Bundesärztekammer aufgestellten „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“, die Werte von mehr als 36g/EK fordern, sind die erreichten Werte sehr gut.



Die Arbeitsgruppe von Moog et al. (4) erreichte Gesamt-Hämoglobin-Werte von  $57,5 \pm 3,0$  g/EK.

Die Qualität eines Erythrozytenkonzentrats für eine Bluttransfusion nach einem massiven Blutverlust ist nicht zuletzt durch die Anzahl des sauerstofftragenden Hämoglobins gekennzeichnet. Man möchte bei der Herstellung der Erythrozytenkonzentrate einen hohen Gehalt an eben diesem Hämoglobin erreichen.

Die mit der MCS- Maschine von Haemonetics durchgeführten Multikomponentenspenden erreichen für die Erythrozytenkonzentrate einen vergleichsweise hohen Wert an Hämoglobin verglichen mit der Literatur : Elfath and al. (2) haben für ein anderes Spendeverfahren, das mit der TRIMA- Maschine von Gambro BCT durchgeführt wurde, Hämoglobinwerte von  $17,5 \pm 1,1$  an Tag 0 und  $17,2 \pm 1,1$  an Tag 42 gewonnen, während die in dieser Studie gefundenen Hämoglobinwerte bei  $19,11 \pm 1,28$  an Tag 0 und an Tag 49 Werte von  $19,15 \pm 1,22$  betragen. Moog et al. (4) haben die Qualität der Erythrozytenkonzentrate untersucht, die mit der AMICUS von Baxter gewonnen wurden und haben dabei Hämoglobinwerte messen können, die an Tag 0 bei  $17,9 \pm 0,5$  und an Tag 42 bei  $18,1 \pm 0,4$  lagen.

Dies wird auch in den Studien von Moog belegt.

Innerhalb der gesetzlichen Vorgaben kann das hergestellte Apharesprodukt arzneimittelrechtlich klar definiert werden.

Weiterhin kann belegt werden, dass es im Zeitraum der Lagerung zu keinem signifikanten Abweichen kommt.

### **3. Hämolyserate**

Die Hämolyserate ist ein entscheidendes Qualitätsmerkmal zur Überprüfung der Qualität von Blutprodukten.

Die Höhe des freien Hämoglobins in den Erythrozytenkonzentraten korreliert mit dem Zerfall der roten Blutkörperchen. Die Höhe des beim Zerfall der Erythrozyten freigesetzten Hämoglobins steht also reziprok zu den noch vitalen, funktionsfähigen Erythrozyten.

Moog et al. (4) haben für das Freie Hämoglobin Werte von annähernd 940 mg/l gefunden. Diese Werte stammen aus dem Diagramm „Fig. 1. Supernating Hb during storage of SAG-M RBC units“. So kann der Wert wegen der Ableseschwierigkeit etwas abweichen von dem errechneten Mittelwert.

Die aus diesem Diagramm abgelesenen Werte liegen bezogen auf den Wert an Tag 42 fast um das Zweifache höher als die Werte in dieser Arbeit. In unserer Studie wurden

Konzentrationen des Freien Hämoglobins von 593,26+/- 608,40mg/l gemessen. Auch Elfath et al. (2) haben Werte von 180+/-82 mg/dl gemessen. Umgerechnet auf die hier verwendete Einheit entspricht dies einem Wert von 1800+/- 820 mg/l. Die Werte aller hier zitierten Studien liegen unter dem von der Bundesärztekammer festgesetzten Höchstwert von 2 g / Einheit.

Da aber der in dieser Arbeit gemessene Wert an Tag 0 mit 266,89 +/- 294,55 mg/l höher ist als der von Elfath et al. (2) an Tag 0 bestimmte Wert bleibt in Folge noch zu klären, welche Faktoren während der Lagerzeit der mit der Haemonetics MCS+ Maschine gewonnenen Produkte protektiv auf die Erythrozytenhaltbarkeit wirkten.

Die Höhe der Hämolyserate hängt ab vom Zerfall der roten Blutkörperchen und ist somit Zeichen der funktionslos gewordenen Sauerstoffträger im Blut. Die Zahl der vitalen roten Blutkörperchen nimmt aus verschiedenen Gründen ab.

Zuallererst unterliegen sie mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 120 Tagen dem schon im Körper begonnenen natürlichen Zerfall.

Darüber hinaus werden einige Blutkörperchen während des Spendeverfahrens durch den Kontakt mit körperfremdem Material zerstört. In diesem Fall sind es das Nadelsystem und die Sammelbeutel der Spendemaschine, sowie das Lagermedium, die CPD- Lösung.

Schließlich herrschen während der Lagerung nicht physiologische Verhältnisse, sodass auch durch diese Tatsache die roten Blutkörperchen einem schnelleren Altern unterliegen.

Es ist außerdem festgestellt worden, dass die Hämolyse stärker ausgeprägt ist, wenn das Produkt nicht leukozytendepletiert wurde (15).

Die in dieser Arbeit gemessenen Hämolyseraten mit Werten von 0,0055 +/- 0,0056% an Tag 0 und 0,02 +/- 0,02% am Ende der Lagerung sind sehr gut vereinbar mit den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“, herausgegeben von der Bundesärztekammer in korrigierter und ergänzter Form (Stand 2001). Diese Richtlinien schreiben einen Wert von unter 0,8% der Erythrozytenmasse vor.

Auch verglichen mit der Studie von Elfath et al. (2) sind die in dieser Arbeit gemessenen Hämolyseraten besser. Elfath et al. haben Hämolyseraten von 0,5+/- 0,2% an Tag 42 gemessen. Moog et al. (4) erreichen Hämolyseraten von 0,23+/-0,12%.

Diese entsprechen wie die Werte der beiden anderen angegebenen Studien den Kriterien der Bundesärztekammer. Sie liegen jedoch um das 10fache höher als die Werte aus dieser Arbeit. Die von Elfath et al. (2) angegebenen Hämolyseraten erreichen sogar 20fach höhere Werte am Ende der Lagerzeit.

Die Gründe für die geringen Hämolyseraten, die mit einem niedrigeren Vergleichswert für das Freie Hämoglobin in dieser Studie konform gehen, sind noch zu diskutieren.

Verwiesen wird darüber hinaus auf die Studie von Hess et al. (3), in der eine geringere Hämolyse bei leukozytendepletierten Produkten im Vergleich zu Produkten, bei denen keine Leukozytendepletion durchgeführt wurde, gemessen wurde.

#### **4. Kalium**

Unsere Ergebnisse der Hämolyserate können mit der K<sup>+</sup>-Freisetzung aus den Erythrozyten plausibilisiert werden.

Das Kalium besitzt seine höchste Konzentration in den Erythrozyten.

Diese beträgt physiologisch das 25fache der Serumkonzentration. Beim Zerfall der roten Blutkörperchen z.B. bei einer unsachgemäßen Blutentnahme und/oder einer unsachgemäßen Lagerung von Blutkonserven kommt es zu einem vermehrten Zerfall der Erythrozyten. Das in den Erythrozyten hochkonzentrierte Kalium wird beim Zerfall freigesetzt, seine Konzentration steigt im Serum oder dem Lagermedium an.

Dieses Ansteigen der Kaliumkonzentration kann wegen der Fremdkörpereigenschaft der Lagerungsbeutel und der unphysiologischen Lagerbedingungen sowie einem gewissen natürlichem Zerfall nicht verhindert werden. Je niedriger diese Konzentration am Ende der Lagerung ist, desto weniger Erythrozyten sind hämolysiert. Wie das freie Hämoglobin und die Hämolyserate verhält sich die Kaliumkonzentration reziprok zu der Anzahl der noch vitalen Erythrozyten.

In der Studie von Relevy et al. (25) wird auch der oxidative Stress bei der Leukozytendepletion für einen höheren Verfall der roten Blutkörperchen verantwortlich gemacht. Die Höhe des Verfalls bei der Leukozytendepletion ist abhängig von dem angewendeten Verfahren. Gamma-Bestrahlung beeinflusst stärker die Erythrozytenphysiologie, als die Filterung. Auch die allgemein angewendete Lagerung bei 4°C bedingt Veränderungen der Erythrozytenphysiologie. Dies zeigt sich in einer Verminderung der Verformbarkeit der Erythrozyten und einer Steigerung der Hämolyserate mit ansteigenden K<sup>+</sup>-Werten.

Die in dieser Studie gemessenen Kaliumwerte liegen verglichen mit der Studie von Elfath et al. (2) mit Werten von 54,34± 5,82 mmol/l an Tag 42 nur unwesentlich höher. Elfath et al. haben in ihrer Studie Werte von 47,9± 6,4 mEq/l an Tag 42 gemessen.

Da allerdings die Ausgangskonzentration des Kaliums an Tag 0 bei Elfath et al. (2) mit  $1,7 \pm 0,4$  mEq/l schon niedriger lag, die Werte dieser Studie lagen bei  $2,10 \pm 0,26$  mmol/l, kann man davon ausgehen, dass bezüglich der Lagerung in diesen beiden Studien keine großen Unterschiede bestanden haben. Genau so verhält es sich mit dem Messergebnis bezüglich des Kaliums in der Studie von Moog et al. (4). An Tag 0 ist die Angabe  $1,7 \pm 0,3$  mmol/l, an Tag 42 beträgt die Kaliumkonzentration  $43,6 \pm 2,7$  mmol/l in den mit dem Zellseparator von Amicus gewonnenen Erythrozytenkonzentrate.

In dieser Arbeit findet sich keine Aussage über die diskrepant höheren  $K^+$ -Werte und der geringeren Hämolyserate.

## 5. Blut-ATP

Adenosintriphosphat (ATP) ist der Energiebaustein für viele Stoffwechselabläufe. Wird bei einem Stoffwechselschritt Energie benötigt, wird vorhandenes ATP in ADP reduziert. Die dabei freiwerdende Energie kann für den Stoffwechselschritt benutzt werden.

Da die Erythrozyten selbst keine Energie herstellen können, müssen sie für ihren Stoffwechsel ATP verbrauchen. Insbesondere benötigen die Erythrozyten das ATP zur Sekretion, um so den Tonus der Zellmembranen aufrecht zu erhalten (3). Die Konzentration an ATP in den Erythrozyten ist somit ein Gütekriterium für die Vitalität der Erythrozyten.

Es ist deswegen nachvollziehbar, dass die Konzentration des ATP im Blut im Verlauf der Lagerung signifikant abnimmt, da die Erythrozyten auch in vivo einem natürlichen Alterungsprozess unterliegen, sodass man auch in vivo sinkende ATP-Konzentrationen messen könnte, wenn keine neuen Erythrozyten im Knochenmark produziert würden.

So sinkt die Konzentration in den Messungen dieser Studie von anfänglich durchschnittlich  $35,35 \pm 3,79$  mmol/dl auf durchschnittlich  $22,87 \pm 4,66$  mmol/dl am Ende der Haltbarkeit der Erythrozytenkonzentrate.

Elfath et al. (2) haben bei der Kontrolle ihrer mit der Trima gewonnenen Erythrozytenkonzentrate anfänglich ATP-Konzentrationen  $37 \pm 0,3$  mmol/dl im Blut gemessen und an Tag 42 Konzentrationen von  $25,5 \pm 0,3$  mmol/dl.

Die Änderungen waren signifikant ( $p = 0,05$ ). Das zeigt wieder den Einfluss der spenderspezifischen Einflussgrößen.

## 6. Hb-ATP

Die unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen bei Moog und Hoegman (Variationskoeffizient 12%) müssen unserer Einschätzung nach im Zusammenhang mit der Methode der ATP-Bestimmung stehen und erklären unter Umständen die Unterschiede.

Die Bestimmung liefert Anhaltspunkte für die Qualität der Produkte, hat aber eine hohe Intra- und Interassay-Variabilität. Es gibt keine Standards.

ATP ist als Haupt-Energielieferant auch ein wichtiger Bestandteil des Hämoglobins. Im Hämoglobin wird ATP ausschließlich aus Glucose gewonnen. Unter aeroben Bedingungen kann aus 1 Mol Glucose 36 Mol ATP entstehen, unter anaeroben Bedingungen entstehen aus 1 Mol Glucose nur 2 Mol ATP. Bei einem neu gewonnenen EK ist der Sauerstoffgehalt initial noch ausreichend, um im Hämoglobin eine aerobe ATP-Gewinnung ablaufen zu lassen. Deswegen ist ein anfänglicher Anstieg der ATP- Konzentration im Hämoglobin, wie er von Moog et al. (4) gemessen wurde, erklärbar.

Dieses Ansteigen der ATP- Konzentration konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden.

Auch sind die ATP- Konzentrationen nicht mit denen von Moog et al. (4) zu vergleichen.

Die von Moog gemessenen Werte liegen mit  $3,1 \pm 0,4 \mu\text{mol/g Hb}$  an Tag 0 deutlich höher als die in dieser Studie gemessene Konzentration von  $1,86 \pm 0,21 \mu\text{mol/g Hb}$ .

Auch die von Högman (10) in den, aus drei verschiedenen Aphaeseverfahren gewonnenenen Erythrozytenkonzentraten gemessenen Werte von  $1,92 \pm 0,51 \mu\text{mol/g Hb}$ ,  $2,3 \pm 0,51 \mu\text{mol/g Hb}$  und  $2,1 \pm 0,4 \mu\text{mol/g Hb}$  liegen deutlich über den in dieser Studie am Ende der Haltbarkeit (Tag 49) bestimmten Werte.

Eine ATP-Depletion korreliert mit einer Veränderung der Erythrozytenform ( Sphärozytose ) und Veränderung ihrer Verformbarkeit (17-[3]). Dies spiegelt sich auch in der Zunahme der Viskosität wider.

## 7. pH

Der pH-Wert sollte am Ende der Haltbarkeit nach den von der Bundesärztekammer aufgestellten „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ zwischen 6,5 und 7,4 liegen.

Dieser Parameter ist der einzige, der in unserer Studie den oben erwähnten Richtlinien nicht entspricht.

In der Literatur fanden sich erniedrigte und erhöhte Werte.

Bubel et al.(8) haben für leukozytendepletierte Thrombozytenkonzentrate pH-Werte messen können, die diesen Richtlinien entsprechen. So lag in der Studie von Bubel et al. (8) der pH an Tag 5 bei  $7,39 \pm 0,08$ .

Die pH-Werte an Tag 5 betrugen  $7,6 \pm 0,11$  und waren zu Tag 1 signifikant verändert.

Hess et al. (3) haben 2001 ihre Studie „The role of electrolytes and pH in RBC ASs“ veröffentlicht. Darin geben sie an, dass das Anheben des Natriumbicarbonates den pH anhebt, was eine höhere ATP-Aktivierung zur Folge hat, aber keine Auswirkungen auf die Hämolyse der Erythrozyten hat. Die Validität dieser diskrepanten Ergebnisse muss klinischen Studien vorbehalten sein.

Ebenso notiert Claes F. Hoegman (10), dass ein höherer pH-Wert die Lagerung der Erythrozyten verbessere.

Übertragen auf die Thrombozytenkonzentrate wäre es denkbar, dass ein höherer pH die Thrombozyten während der Lagerzeit stabilisiert. Verwiesen wird in diesem Zusammenhang auf die Arbeit von Wadhwa et al. (5), die zwei Spendeverfahren im Vergleich testeten hinsichtlich der Cytokine in Thrombozytenkonzentrate. Der auch in dieser Arbeit benutzte MCS+Zellseparator der Firma Haemonetics hatte zwar an Tag 1 höhere Konzentrationen der gemessenen Cytokine, jedoch verzeichnete deren Konzentration keinen so starken Anstieg, wie die Cytokinkonzentrationen der Produkte, die mit einem Spectra LRS- Zellseparator gewonnen worden waren. Wadhwa notiert insbesondere bei dem Spectra-Verfahren einen Abfall des pH-Wertes während der Lagerung.

Högman (10) verweist jedoch auf die Gefahr des Verklumpens von Thrombozyten bei höherem pH, der vor allem schon bei der Spende zu einem Stören des Spendeverfahrens führen kann, da sich Gerinnsel vor allem auch im Separator bilden könnten.

Feststellen ließ sich das weder bei den von Högman durchgeführten Apharesen, als auch den hier durchgeführten Spenden, jedoch erwähnte Krailadsiri das Vorfinden von reversiblen Plättchenaggregationen bei höherem pH-Wert (14)

In einer von S. Holme veröffentlichten Studie wird dahingegen auf die negativen Auswirkungen eines zu niedrigen PH-Wertes während der Lagerung von Thrombozytenkonzentraten hingewiesen. Es gibt Anzeichen dafür, dass Mitochondrienschäden, die sich durch einen Verlust der respiratorischen Aktivität und des zellulären ATPs äußern, mit einem Abfall des pH-Wertes während der Lagerung zusammenhängen (13).

Högman (10) und wir fanden keine erhöhte Plättchenaggregation.

## 8. Thrombozyten

Die Thrombozytenzahlen in den Thrombozytenkonzentraten blieben während der Lagerung konstant und sind auch mit den Ergebnissen anderer Studien vergleichbar (14).

## 9. $\beta$ -Thromboglobulin

Den Einfluss des A-Systems unterstreichen die Arbeiten von Bubel et al. (8).

Das Bestimmen des  $\beta$ -Thromboglobulinwertes während der Lagerung der Thrombozytenkonzentrate soll den Grad der unerwünschten Plättchenaktivierung erkennen lassen. „ $\beta$ -Thromboglobulin ist ein in den Alpha-Granula der Thrombozyten enthaltenes Protein, das die Prostazyklinsynthese der Endothelzellen hemmt“ (Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage; de Gruyter).  $\beta$ -Thromboglobulin ist ein Thrombozytenaktivator.

Die im Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universitätskliniken Homburg/Saar durchgeführte Multikomponentenspende mit dem MCS+-Zellseparator der Firma Haemonetics hat für diesen Parameter Werte erreicht, die mit Werten von 241,88 $\pm$ 12,83 IU/ $\mu$ l an Tag 0 konstant geblieben sind.

Dahingegen haben S. Bubel et al. (8) einen signifikanten Anstieg dieses Parameters während der Lagerung zu verzeichnen. Ihre Werte liegen an Tag 0 bei 67,635 $\pm$ 68,947 IU/ml und steigen während der hier 8tägigen Lagerung auf Werte von 212,607 $\pm$ 198,694 IU/ml an.

Die Thrombozytenkonzentrate wurden von Frau Bubel in diesem Fall mit einem Zellseparator hergestellt (CS-3000 Plus der Firma Baxter Biotech, München).

Ein anderes von ihr zum Vergleich durchgeführtes Verfahren ist die Filterung von einem Pool aus vier Thrombozytenkonzentraten und einem Plasma (SCD 312 Haemonetics, Braintree, Ma). Das verwendete Plasma stammt von einem Spender der vier gepoolten Thrombozytenkonzentrate. Diese Produkte wiederum wurden aus 450 ml gewonnenem Vollblut in die Bestandteile Plasma; Thrombozytenkonzentrat und Erythrozytenkonzentrat durch die Optipress-Maschine von Baxter Biotech fraktioniert.

Bei diesem Verfahren wurden Werte erreicht, die an Tag 0 zwar höher waren als die mit dem CS-3000 Plus-Zellseparator gewonnenen Werte aber während der Lagerung nicht diesen starken Anstieg verzeichneten. Die bei dem letztbeschriebenen Verfahren ermittelten Werte steigen von 112,924 $\pm$ 81,968 IU/ml an Tag 0 auf 192,145  $\pm$ 62,465 IU/ml an.

In einer anderen Studie, in der zur Herstellung der leukozytendepletierten Thrombozytenkonzentrate wie in dieser Arbeit der MCS+-Zellseparator verwendet wurde

(Wadhwa et al. (5)), wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg der gemessenen Zytokine verzeichnet.

Wadhwa hat in seiner Studie das MCS+LDP-Verfahren mit dem Spectra LRS-Verfahren verglichen. In diesem Vergleich wurden zwar an Tag 1 höhere Konzentrationen von  $\beta$ -TG und PF 4 bei den durch den MCS+ Zellseparator gewonnenen Produkte gefunden, jedoch waren im Verlauf der Lagerung deren Konzentration stabiler.

Wie das oben erwähnte  $\beta$ -Thromboglobulin, so zeigt auch der Plättchenfaktor 4 eine Plättchenaktivierung während der Lagerzeit in den Thrombozytenkonzentraten an.

Im Körper unter physiologischen Voraussetzungen hat PF4 die Aufgabe, die der Chemotaxis für Neutrophile, Monozyten und Fibroblasten zu steuern. Außerdem bewirkt PF4 die Degranulation von Neutrophilen, die Histaminfreisetzung aus Basophilen und weitere immunregulatorische Eigenschaften. (nach Bubel et al. (8)). Für diesen Parameter haben Bubel (8) und Wadhwa (5) signifikant ansteigende Werte, wohingegen dieser Parameter bei dieser Studie signifikant abfällt.

## **10. Elastase**

Elastase ist ein proteolytisches Enzym, das in der Klinik bei der Diagnostik der Pankreatitis, (pankreasspezifisch ist die Elastase 1), Traumata und Sepsis, sowie bei chronisch Entzündungsprozessen erhöht ist, weil es bei Phagozytoseprozessen (Entzündung) und Granulozytenzerfall freigesetzt wird. In früheren Studien wurde während der Lagerung ein direktes Verhältnis des Anstieges der Elastase-Konzentration mit der vorhandenen Leukozytenkonzentration in den gelagerten Produkten gesehen (20). Ebenso wurde eine Abhängigkeit des Anstieges der Elastase-Konzentration von einer Temperatur über 6°C festgestellt.

Die Lagerung der Thrombozytenkonzentrate bei Raumtemperatur ist vorgeschrieben.

## **11. Thrombin- Antithrombin III**

Thrombin kommt im Blut überwiegend in einem Komplex mit Antithrombin gebunden vor.

Die Bestimmung des Komplexes spiegelt daher das Ausmaß thrombinspezifischer, intravasaler Gerinnungsprozesse wider.

Ursache einer erhöhten TAT- Konzentration im Plasma können Verbrauchskoagulopathien, Vaskulopathien, Polytraumata, pAVK, Schock, Herzinfarkt und frische Wundflächen sein.



Auch bei malignen Erkrankungen wurden in Abhängigkeit zum Tumorstadium erhöhte TAT-Spiegel festgestellt (22).

Bei der Herstellung der Thrombozytenkonzentrate kann man die Konzentration der Thrombin- Antithrombinkomplexe als Gütekriterium für ein ausreichendes Zusetzen von Antikoagulantien und für die adäquate Lagerung der Produkte bestimmen.

Während der Lagerung kam es bei den hier gewonnenen Thrombozytenkonzentraten zu keiner signifikanten Veränderung dieses Parameters.

## **12. Komplementsystem**

Da man vermutet, dass die nach Transfusionen von ungefilterten roten Blutkörperchen verstärkt auftretende Leukozytose durch Zytokine im Blutprodukt hervorgerufen werden, wurde als Qualitätsparameter in dieser Studie ein wichtiges Chemotaxin, der Komplementfaktor C5a bestimmt.(7- [1,2]). Hetland et al. (7) haben diesen Parameter in Thrombozytenkonzentraten gemessen, die nicht leukozytendepletiert wurden und diese Messergebnisse mit Messergebnissen von gefilterten Thrombozytenkonzentraten verglichen.

Bei den gefilterten, leukozytendepletierten Produkten sind Werte gefunden worden, die mit den von mir gefundenen Werten gut übereinstimmen. Hetland et al. (7) haben für den Komplementfaktor C5a an Tag 5 Werte um 2µg/l gefunden. Die Werte dieser Studie lagen an Tag 5 um 1,33 µg/l. Demgegenüber stehen die Ergebnisse der ungefilterten Produkte, bei denen Hetland et al.(7) Werte um 11µg/l gemessen haben.

Bei der Testung des Komplementsystems wurde ein signifikanter Unterschied gefunden, die Werte stiegen während der Lagerung signifikant an. In der Studie von Hyllner et al. (12), der die Komplementaktivierung während der Lagerung in Vollblut, Plasma und Erythrozytenkonzentraten verglichen hat, fand Hyllner einen signifikanten Anstieg der Anaphylatoxine in Vollblut und Plasma, nicht aber in den in SAGM gelagerten Erythrozytenkonzentraten.

Viele Studien haben die Verantwortung der Chemotaxine für unerwünschte Nebenwirkungen bei Transfusionen, wie etwa Fieber, bewiesen. Deutlich kann gezeigt werden, dass mit einer Leukozytendepletion die Konzentration von Chemotaxinen im Spendekonzentrat stark reduziert werden kann. Also ist die Höhe der noch vorhandenen Cytokine ein Qualitätsmerkmal für die erfolgreiche Leukozytendepletion (27), (28).

Deswegen hat Kanada im ersten Quartal 1998 die generelle Leukozytendepletion eingeführt (6).Vamvakas et al. (6) haben allerdings auch Quellen aufgeführt, die unerwünschte Transfusionsreaktionen mit dem Gebrauch von Leukozytendepletionsfiltern assoziiert haben.

### 13. Zeit

Die Multikomponentenspende hat 108 $\pm$  3 Minuten gedauert. Der Zeitfaktor ist der limitierende Faktor bei der Produktivität. Es gibt andere Separatoren z.B. die Trima, die für gleichwertige Produkte 59 Minuten benötigen (s. Stolte Joachim, Dissertation, Homburg Saar, 2005). Moog et al. (4) benötigten für die Herstellung eines Erythrozytenkonzentrates und eines Thrombozytenkonzentrates 74 $\pm$  9 Minuten mit dem Amicus blood cell separator.

In einer im Januar 2008 in der Fachzeitschrift TRANSFUSION aufgeführten Studie wurde von AuBuchon et al. (26) das Cymal RBC collector system (Haemonetics, Braintree, MA) vorgestellt. Dieses Verfahren benötigt 40,3 $\pm$ 2,7 Minuten für die Herstellung von 2 leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten.

In einer anderen Studie verglichen Moog et al. 3 Blutzellseparatoren, den Amicus-Separator von Baxter, die Apheresis System Technology [AS-TEC] 204 von Fresenius und die MCS+ von Haemonetics. Dort fiel die MCS+ hinsichtlich der Zeit aus dem Rahmen. Sie benötigte wegen des diskontinuierlichen Flusses mehr Zeit, verbrauchte jedoch weniger Zusatz an Antikoagulantien und hatte verglichen mit den anderen beiden Spendeverfahren die effektivste Leukozytendepletion (16). Dies erklärt unter Umständen auch die unterschiedlichen Ergebnisse von pH und ATP.

Es gibt nur eine Studie von Quendro zur Akzeptanz der Spender:

Quendro et al. (9) haben die in ihrem Institut spendenden Personen zu Multikomponentenspenden befragt und dabei folgende Informationen erhalten:

92,4% der Spender stimmen der Multikomponentenspende gerne zu. Die Minimierung der Transfusionszwischenfälle ist für die meisten dabei der Beweggrund, der Zeitfaktor tritt in den Hintergrund.

Die Akzeptanz der Spender war auch in unserer Studie da. Es gab keine Beschwerden wegen der langen Spendezeit., weil es sich ausschließlich um Thrombozytenapharesespender handelte.

## **14. Schlussfolgerung**

Abgesehen vom pH der Thrombozytenkonzentrate entsprechen die gewonnenen Erythrozytenkonzentrate und Thrombozytenkonzentrate den gesetzlichen Vorgaben.

Man kann ebenso aus dem oben Gesagten ableiten, dass die Herstellungskosten geringer sein werden, als bei der früher praktizierten Vollblutspende und dem anschließenden Separieren in die einzelnen Konzentrate. Die mögliche Kontaminierung der Produkte mit Erregern oder die Ansteckungsgefahr der Anwender und Patienten wird ebenso verringert.

Verglichen mit anderen Maschinen, die für die Multikomponenten- Spende entwickelt wurden und angewendet werden, muss allerdings bei dem MCS+-Zellseparator der enorme Zeitaufwand berücksichtigt werden, der natürlich auch mit einer geringeren Produktivität einhergeht.

Die Technik der Multikomponentenspende wird deswegen bei externen Spendeterminen nicht zum Einsatz kommen und wird Blutspendeinstituten an Schwerpunktkrankenhäusern vorbehalten bleiben.

Die Qualität der hergestellten Produkte kann höchstens am Increment der Patienten gemessen und kann deswegen nur klinischen Studien vorbehalten bleiben (Hb-Anstieg und Thrombozytenincrement).

## 6. Literaturverzeichnis

### 1. Paul J. Schmidt

The first photograph of blood transfusion (2001) TRANSFUSION, Volume 41: 968-969

### 2. M. Dean Elfath, Pamela Whitley, May S. Jacobson, Kathy Cranfill- Hupp, Donna M. Kemp, Deanna Mc Neill, Sherrie Sawyer, Sharon Bell-Dize, Jed B. Görlin, Sherwin V. Kevy, Michael J. Mc Ateer

Evaluation of an automated system for the collection of packed RBC's, platelets and plasma (2000) TRANSFUSION, Volume 40: 1214-1222

### 3. John R. Hess, Neeta Rugg, Amy D. Knapp, Jennifer F. Gormas, Heather R. Hill, Cindy K. Oliver, Lloyd E. Lippert, Tibor J. Greenwalt

The role of electrolytes and pH in RBC Ass (2001) TRANSFUSION, Volume 41: 1045-1051

### 4. Rainer Moog, Valentine Franck, Jennifer A. Pierce, Norbert Müller

Evaluation of a concurrent multicomponent collection system for the collection and storage of WBC- reduced RBC apheresis concentrates (2001) TRANSFUSION, Volume 41: 1159-1164

### 5. Meenu Wadhwa, M. Jerhard Seghatchian, Paula Dilger, Dawn Sands, Pranee Krailadisiri, Marcela Contreras, Robin Thorpe

Cytokines in WBC-reduced apheresis PCs during storage: a comparison of two WBC-reduction methods (2000) TRANSFUSION, Volume 40: 1118-1126

### 6. Eleftherios C. Vamvakas, Morris A. Blajchman

Universal WBC-reduction: The case for and against (2001) TRANSFUSION, Volume 41: 691-712

### 7. G. Hetland, T. E. Mollnes, K. Bergh, K. Høgåsen, U. E. Bergerud, and B. G. Solheim

Effect of filtration and storage of platelet concentrates on the production of the chemotaxins C5a, Interleukin 8, tumor necrosis factor  $\alpha$  and leukotriene B<sub>4</sub> (1998) TRANSFUSION, Volume 38: 16-23

**8. S. Bubel, D. Wilhelm, M. Entelmann, H. Kirchner, H. Klüter**

Chemokines in stored platelet concentrates (1996) TRANSFUSION, Volume 36: 445-449

**9. Quendro I., Moog R., Müller N.**

A questionnaire: Will platepheresis donors accept multicomponent donation? (2002, abstract)

**10. Claes F. Högman**

Liquid- Stored Red Blood Cells for Transfusion (1999) VOX SANG, Volume 76: 67-77

**11. P. F. van der Meer, R. N. I. Pieterz, B. Hinloopen, W. J. A. Dekker, H. W. Reesink**

Automated Separation of Whole Blood in Top and Bottom Bags into Components Using the Compomat G4 (1999) VOX SANG, Volume 76: 90-99

**12. M. Hyllner, J. P. Arnestad, J. P. Bengtson, L. Rydberg, A. Bengtsson**

Complement activation during storage of whole blood, red cells, plasma and buffy coat (1997) TRANSFUSION, volume 37: 264-268

**13. S. Holme**

Storage and Quality Assessment of Platelets (1998) VOX SANG, Volume 74-Suppl.2: 207-216

**14. P. Krailadisiri, J. Seghatchian**

Are All Leucodepleted Platelet Concentrates Equivalent? (2000) VOX SANG, Volume 78: 171-175

**15. J. P. Au Buchon, M.D. Elfath, M. A. Popovsky, R. R. Stromberg, C. Pickard, L.**

**Herschel, P. Whitley, D. Mc Neil, S. Arnold, J. L. O'Connor**

Evaluation of a New Prestorage Leukoreduction Filter for Red Blood Cell Units (1997) VOX SANG, Volume 72: 101-106

**16. R. Moog, N. Müller**

White cell reduction during plateletapheresis: a comparison of three blood cell separators (1999) TRANSFUSION, Volume 39: 572-577

**17. R. Mansouri Thalegani, R. Großmann, G. Waltenberger, W. Geise, R. Langer, H. A. Heinrich, D. Wiebecke**

Lagerungsbedingte rheologische und biochemische Veränderungen von Erythrozytenkonzentraten in additiver Lösung und deren mögliche Zusammenhänge (1996)

SIBROWSKI W., STANGEL W., BLAUHUT B. (Hrsg.): TRANSFUSIONSMEDIZIN 1995/96, BEITR INFUSIONSTHER TRANSFUSIONSMED. BASEL, KARGER, 1996, Volume 33: 141-144

**18. Mark L. Kahn**

Platelet-Collagen Responses: Molecular Basis and Therapeutic Promise (2004) SEMINARS IN THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, Volume 30, number 4: 419-425

**19. Boris Krischek, Werner Brannath, Ute Klinckhardt, Jochen Graff, Ulrich Wieding, Amah Nemeh, Walter Heinrich, Jochen Schenk, Thomas Wenzel, Ernst Wenzel**

Role of Retention Test Homburg in Evaluating Platelet Hyperactivity and in Monitoring Therapy with Antiplatelet Drugs (2005) SEMINARS IN THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, Volume 31, number 4: 458-463

**20. J. Wallvik, A. M. Suontaka, M. Blombäck**

Proteolytic activity during storage of platelets in plasma (1991) TRANSFUSION MEDECINE, Volume 2: 135-142

**21. Kadletz Wolfgang**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereiches Medizin der Justus- Liebig Universität Gießen „Spontanaggregation der Plättchen in der perioperativen Phase, gemessen mit der Impedanzaggregometrie und Partikelzählung“, Rigorosum 14.12. 2004

**22. U. Budde**

Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie ( 2002 ) J LAB MED, Volume 26(11/12): 564-571

**23. Niels Brüggemann**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin in der Medizinischen Hochschule Hannover „Bedeutung der hereditären Thrombophilie für Klinik und Haemostasesystem gesunder Thrombozytenspender“

**24. Birgit S. Gathof et al.**

In vitro quality of red blood cells (RBCs) collected by multicomponent apheresis compared to manually collected RBCs during 49 days of storage (2007) TRANSFUSION, Volume 47: 687-696

**25. Hanna Relevy et al.**

Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties (2008) TRANSFUSION, Volume 48: 136-146

**26. AuBuchon J. P. et al.**

Automated collection of double red blood cell units with a variable- volume separation chamber (2008) TRANSFUSION, Volume 48: 147-152

**27. Wadhwa M. et al.**

Cytokine levels as performance indicators for white blood cell reduction of platelet concentrates. (2002) VOX SANGUINIS, Volume 83(2): 125-136

**28. Wadhwa M. et al**

Cytokines in WBC-reduced apheresis PCs during storage: a comparison of two WBC-reduction methods. (2000) TRANSFUSION, Volume 40(9): 1118- 1126

## 8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich-Theo Seyfert für die Vergabe des Dissertationsthemas.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Bernhard Stephan danken für die gute Betreuung während der Arbeit.

Weiterhin möchte ich dem Team der Blutspende des Universitätsklinikums Homburg danken.

Bedanken möchte ich mich schließlich auch bei meiner Familie für die langjährige Unterstützung in oft schwierigen Zeiten dieser Arbeit.



## 9. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name:	Corinna Lottmann
Wohnort:	Petersbergstraße 56 66119 Saarbrücken Tel.: 0681/582975
Geburtstag und -ort:	01. 01. 1979 in Saarbrücken
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

### Schulbildung

08.1985–06.1989:	Grundschule
09.1989–06.1998:	Gymnasium
27.06.1998	deutsch-französisches Abitur

### Berufsausbildung

10.1998–09.2000 13.09.2000	<b>Vorklinisches Studium</b> /Universität des Saarlandes Ärztliche Vorprüfung mit der Note Befriedigend (3,33)
10.2000–08.2001 28.08.2001	<b>Erster klinischer Studienabschnitt</b> /Universität des Saarlandes Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note Ausreichend
10.2001–09.2003 09.09.2003	<b>Zweiter klinischer Studienabschnitt</b> /Universität des Saarlandes Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note Befriedigend (2, 66)
10.2003–10.2004	<b>Praktisches Jahr</b> /Universität des Saarlandes

- I. Chirurgie:** als Erasmus-Studentin am Centre Hospitalier de la Pitié-Salpêtrière,  
service de chirurgie générale, digestive et endocrinienne,  
Professeur Chigot/Université Pierre et Marie Curie, Paris VI
  
  - II. Neurologie:** Neurologische Abteilung des  
Bundesknappschaftskrankenhauses Püttlingen, akademisches  
Lehrkrankenhauses der Universität des Saarlandes,  
Dr. med. Dipl. Math. Jäger
  
  - III. Innere:** Internistische Abteilung des Bundesknappschaftskrankenhauses  
Püttlingen, akademisches Lehrkrankenhauses der Universität des  
Saarlandes, Dr. med Maier
- 28.10.2004                      Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note Gut

### Studienbegleitende Tätigkeiten

#### Famulaturen:

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 02.2001–03.2001 | HNO-ärztliche Famulatur/Praxis Frau Dr. med. Verena Maurer,<br>Saarbrücken                            |
| 09.2001–10.2001 | Innere- Famulatur/Institut für Hämostaseologie und<br>Transfusionsmedizin, Universität des Saarlandes |
| 02.2002–04.2002 | Innere- Famulatur/Institut für Hämostaseologie und<br>Transfusionsmedizin, Universität des Saarlandes |
| 07.2002–08.2002 | Innere- Famulatur/Städtisches Krankenhaus Neunkirchen/Saar  |

### Facharztausbildung

- |                                  |  |
|----------------------------------|--|
| Vom 15.11.2004<br>Bis 30.06.2006 | Assistenzärztin in der Inneren Medizin,<br>St. Josefs–Krankenhaus Hilden<br>Dr. med. Lipke                   |
| Seit dem 01. 07.2006             | Assistenzärztin in der Neurologie<br>Bundesknappschafts Krankenhaus Püttlingen<br>Dr. med. Dipl. Math. Jäger |

### Sonstiges

- |          |  |
|----------|--|
| Sprachen | 9 Jahre Französisch<br>5 Jahre Latein<br>5 Jahre Englisch<br>4 Jahre Italienisch |
|----------|--|

## 7. Anhang

ADP = Adenosindiphosphat

ATP = Adenosintriphosphat

EK = Erythrozytenkonzentrat

Hb = Hämoglobin

PF4 = Plättchenfaktor 4

RBC = Red Blood Cell

TK = Thrombozytenkonzentrat

Zu 3.2:

*das Haemonetics-MCS +LN09000-220E/ED leukozytendepletierte Thrombozyten und Erythrozyte -LDPRC–Protokoll*

Das Haemonetics-MCS+LN09000-220E/ED leukozytendepletierte Thrombozyten und Erythrozyten-LDPRC–Protokoll verwendet ein Einmalschlauchset. Dieses funktionell geschlossene Set dient zur Sammlung von Thrombozyten bzw Thrombozytenpräparaten und roten Blutkörperchen.

Die Bestandteile des Sets stehen in einer Verbindung und bestehen aus

- 1.) Schlauchführungsleiste
- 2.) Glocke
- 3.) Plasmabeutel
- 4.) Thrombozyten-Primärsammelbeutel
- 5.) SPM Luer-Anschluss
- 6.) DPM Luer-Anschluss
- 7.) Blutfilter
- 8.) Bakterienfilter
- 9.) Thrombozytenlagerungsbeutel
- 10.)Injektionsanschluss
- 11.)Nadel
- 12.)Probenbeutel
- 13.)Thrombozyten-Leukozytendepletionsfilter
- 14.)Erythrozyten-Primärsammelbeutel
- 15.)Erythrozyten-Lagerungsbeutel
- 16.)Erythrozyten-Leukozytendepletionsfilter

Für das Spendeverfahren wird folgendes Material benötigt:

- 1.) MCS+Einmalset für leukozytendepletierte Thrombozyten und Erythrozyten, Artikelnummer 946 FF mit Leukozytendepletionsfiltern für Erythrozyten und Thrombozyten
- 2.) LDPRBC Protokollkarte Nr. 89908-01
- 3.) ACD-A Antikoagulans (500 ml)
- 4.) SAG-M Additivlösung 140 ml (Art.-Nr. 410)
- 5.) Venenpunktionsmaterial
- 6.) Klemmen

Prinzip des verwendeten Spendeprotokolls der Firma Haemonetics für die Multikomponentenspende mit der MCS+LN09000-220E/ED-Maschine

Nach dem Einschalten der Maschine erscheinen auf dem Monitor des Haemonetics-Zellseparators Anweisungen für die Installation des zu verwendenden Einmalsets und der Substitutionslösungen, sowie zum Vorfüllen. Diese sind der Reihe nach zu befolgen.

Danach werden Spender- und Verfahrensdaten in den Haemocalculator eingegeben, die für die Durchführung der Spende notwendig sind:

Daten für den Haemocalculator

Geschlecht	Ziel-Erythrozyten (das zu sammelnde Erythrozytenvolumen in ml)
Größe in cm	Ziel-Plasmagewicht in g
Gewicht in kg	Ziel-Ausbeute (Gesamt-Erythrozytenzahl im Erythrozytenkonzentrat)
Blut-Volumen (von der Maschine aus Körpergröße und –gewicht des Spenders errechnet )	Prozessiertes Volumen in ml
Hämatokrit in% (Angaben aus der Messung einer vorher entnommenen Blutprobe des Spenders)	Ziel Zyklen (Anzahl der zu durchlaufenden Zyklen, die benötigt werden, um das gewünschte Volumen zu sammeln)
Platelet-Pre-Count (Angaben aus der Messung einer vorher entnommenen Blutprobe des Spenders)	Geschätzte Zeit in min

Während der Spende gibt das auf dem Monitor erscheinende Verfahrensupdate Informationen über die abgelaufene Zeit, das verbrauchte Antikoagulans-Volumen, das dem Spender zugeführte Kochsalz-Volumen, das schon verwendete Volumen an Additivlösung für das Erythrozytenkonzentrat, das laufende entfernte Buffy-Coat-Volumen sowie Produktinformationen.

Angegebene Produktinformationen, die sich auf das fertige Blutprodukt beziehen, sind:

Plasma-Gewicht, Thrombozyten-Gewicht, geschätzte Ausbeute (geschätzte Anzahl der gewonnenen Thrombozyten), die vorher programmierte Zielausbeute sowie das gesammelte Erythrozytenkonzentrat.

Das von uns verwendete Antikoagulans CPD für das Erythrozytenkonzentrat wurde in einem Verhältnis von 1: 13, d. h.: 1ml Antikoagulans auf 13 ml Erythrozytenkonzentrat, dem Erythrozytenkonzentrat zugegeben.

### Prinzip des Spendeverfahrens

Eine definierte Menge Blut wird pro Zyklus dem Spender über die liegende Nadel des Einmalsets entzogen und in der Glocke gesammelt, bis sich ausreichend Volumen in der Glocke befindet.

Durch eine Zentrifuge wird das in der Glocke enthaltene Blutvolumen vom Buffycoat getrennt und die Thrombozyten, Erythrozyten und auch das Plasma in die dafür vorgesehen Beutel geleitet.

Das Plasma wird dem Spender mit dem Buffy-Coat zurückgegeben.

Die Additivlösung wird am Ende des letzten Zyklus dem Erythrozytenkonzentrat zugegeben und zwar abhängig vom tatsächlichen Gewicht des gesammelten Erythrozytenkonzentrats im vorgegebenen Verhältnis.

Vor dem endgültigen Beenden des kompletten Spendeverfahrens wird dem Spender über das noch liegende Nadelsystem eine erneute Blutprobe entnommen zur Bestimmung der Blutwerte des Spenders nach der Spende. Die Nadel wird gezogen und die gewonnenen Produkte durch die Maschine automatisch gewogen. Die Gewichte der Spendeprodukte und verwendete Volumina der Additivlösung und der Kochsalzlösung werden auf dem Monitor angezeigt.

Anschließend werden die Verbindungsschläuche steril abgeschweißt, die Produktbeutel von der Maschine getrennt und den Richtlinien entsprechend behandelt:

Das Thrombozytenkonzentrat wird auf den Schüttler gelegt, das Erythrozytenkonzentrat noch durch einen Filter leukozytendepletiert.

#### Lagerung und Verwendung von Erythrozyten

Die EK werden bei +4°C in Kühlräumen mit fortlaufender Temperaturregistrierung gelagert.

Es wird darauf geachtet, dass die Kühlkette nicht unterbrochen wird.

Die Verwendbarkeit der EK ist auch mit der Additivlösung SAG-M, die eine längere Haltbarkeit ermöglicht, auf 49 Tage beschränkt.

#### Qualitätskriterien von leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten

Präparat	Volumen (ml)	Hkt l/l	Gesamt-Hb	Rest-Leukozyten	Restplasma (ml)	Hämolyse (%)
Leukozyten-Depletiertes EK	200-350	0,50-0,70	> 40 g (> 24,8mmol)	$< 1 \cdot 10^6$	< 25	< 0,8

Die Qualität des EK-Präparates wird durch die Leukozytendepletion verbessert. Die Übertragung zellulärer Viren wird so weitgehend reduziert und das Risiko einer Immunisierung gegen Leukozytenantigene (HLA-Antigene) stark reduziert.

Die Hämolyserate am Ende der Laufzeit darf 0,8% der Erythrozytenmasse nicht überschreiten.

#### Physiologie der Erythrozyten

Erythrozyten tragen Hämoglobin, das für den Gasaustausch und Transport von Atemgasen in Lunge, Gewebe und Blut verantwortlich ist. Als Folge der extrakorporalen Lagerung kommt es in den Blutkonserven aufgrund von komplexen Veränderungen zu „Lagerungsschäden“, die sich durch

- funktionelle Beeinträchtigungen (z.B.: Linksverschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve)
- morphologischen Formveränderungen (z.B.: Stechapfelform)
- Freisetzung von Inhaltsstoffen (z.B.: Kalium; Hämoglobin)

erkennen lassen.

### zu 3.3.1 die Nageotte-Kammerzählung (Leukozyten im Erythrozytenkonzentrat)

Zum Nachweis der Qualität der Erythrozyten-Depletionsfilter wurden am Spendetag mit Hilfe der Nageotte-Kammerzählung die verbliebenen Leukozyten im gewonnenen Erythrozytenkonzentrat mikroskopisch bestimmt. Dazu werden 100µl des Konzentrates mit 900µl Türk-Lösung verdünnt und sanft durchmischt.

Nach 10 minütigem Stehenlassen wurden 75µl dieser verdünnten Probe in eine saubere und trockene Nageotte-Kammer der Firma Poly Labo/Strasbourg, France mit Deckglas gefüllt.

Diese Anordnung verbleibt für 10 – 30 Minuten zur Sedimentation der Leukozyten in einem Feuchtraum.

Anschließend werden 40 Reihen (ein Zählnetz, entsprechend 50 µl der Probe d.h. 5µl des Erythrozytenkonzentrates) in 200-facher Vergrößerung unter einem Phasenmikroskop gezählt.

Die Gesamtleukozytenzahl errechnet sich nun wie folgt:

20 gezählte Leukozyten in 40 Reihen entsprechen einem Leukozyten je µl.

Der Inhalt eines Erythrozytenkonzentrates sei 250 ml.

1 Leukozyt/µl = 1000 Leukozyten ml

$1000 \text{ Leukozyten/ml} * 250 \text{ ml} = 0,25 * 10^6$

Dies entspricht ¼ des Grenzwertes.

### zu 3.3.2 die Nageotte-Kammerzählung (Leukozyten im Thrombozytenkonzentrat)

495 µl Thrombozytenkonzentrat werden in eine mit 1,98 µl Ammoniumoxalat gefüllte Unopette der Firma Becton-Dickenson gegeben.

Anschliessend wird die mit dieser Probe gefüllte Nageotte-Kammer für 10 Minuten in eine feuchte Petrischale gebracht. Dies dient der Sedimentation der Leukozyten.

Die Auswertung erfolgt bei 200 facher Vergrößerung unter dem Phasenmikroskop.

Auswertungsbeispiel:

Gesamtzahl der gezählten Leukozyten = N

= gezählte Leukozyten in Kammer 1 + gezählte Leukozyten in Kammer 2

$L / \mu\text{l} = N * \text{Verdünnungsfaktor} : \text{ausgezähltes Volumen}$

$L / \mu\text{l} = N * 10 : 100 \mu\text{l}$

$L / \mu\text{l} = N * 0,1$

### zu 3.3.3 Die Neubauer-Kammerzählung (Erythrozyten im Thrombozytenkonzentrat)

benötigtes Material:

-Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, Fläche 1/400 qmm (kleines Quadrat), 1/16 qmm

(Gruppenquadrat), 1/9 qmm (großes Quadrat)

-Hayem'sche Lösung (Fa. Merck)

-10–100 µl Pipetten

-Eppendorf-Cups

Verdünnung der Probe

100 µl der Probe (TK) werden mit 900 µl Hayem'scher Lösung in einem Eppendorf-Cup gemischt.

Dies entspricht einer Verdünnung 1:10

Die Neubauer-Kammer wird anschließend gefüllt und unter dem Phasenmikroskop in

200 bzw. 400 facher Vergrößerung gezählt.

Auswertung

Ausgezählt werden 5 Gruppenquadrate:

Gesamtzahl der gezählten Erythrozyten = N

Erythrozyten/ $\mu\text{l}$  =

N:  $1/5$  (Fläche der 5 ausgezählten Quadrate) \*  $1/10$  (Tiefe) \*  $1/10$  (Verdünnung)

$E/\mu\text{l} = N * 5 * 10 * 10$

$= N * 500$

### zu 3.3.4 pH-Messung

Verwendet wird ein pH-Radiometer, ein PHM 64 Research pH-Meter der Firma Copenhagen.

Geeicht wird das Gerät mit destilliertem Wasser. Dabei geht man wie bei der eigentlichen Messung vor (siehe unten) und stellt das Gerät, falls erforderlich, nach Einpendeln des Gerätes auf Null.

Die pH-Messung des Thrombozytenkonzentrates erfolgt, indem die Glaskapillare der Messsonde frei hängend in ein Reagenzglas mit Thrombozytenkonzentrat getaucht wird und der pH-Wert sich einstellt. Bleibt die Digitalanzeige des Gerätes längere Zeit konstant bei einem Wert stehen, wird dieser als der pH-Wert der Probe abgelesen.

### zu 3.3.5 Blutbild

Das Blutbild wurde automatisiert mit dem Gerät Sysmex SF3000 der Firma Sysmex Hamburg im Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universitätskliniken Homburg/Saar gemessen. Dieses Gerät bestimmt die Zellzahl von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten mittels Impedanzmessung. Weiterhin werden mit diesem Verfahren der Hämoglobinwert, der Hämatokrit und das mittlere Erythrozytenvolumen bestimmt. Letzteres ist der Quotient aus dem Hämatokrit und der Erythrozytenzahl.

### zu 3.3.7 Erythrozyten-Aggregation:

Durchgeführt wird die Messung in dem Gerät Myrene der Firma Myrene

1.

Vor der eigentlichen Messung wird bei leerer Messkammer ein Abgleich vorgenommen, um eine eventuelle unterschiedliche Transparenz der Messkammer auszugleichen (z. B. ungenügende Reinigung), sodass eine Plasmatrübung und unterschiedliche Elongationsgrade der Zellen zu Beginn der Messung keine Rolle spielen.

2.

50 $\mu\text{l}$  des EK-Blutes werden nach vorsichtigem Mischen auf den Unterteil des Messblocks gegeben, in das ein rotierender, transparenter Kegel eingelassen ist. Darüber ist eine Glasplatte angebracht, die mit einer Gelenkachse an der klappbaren Oberkammer befestigt ist.

Nach Schließen der Oberkammer kann nun die Messung erfolgen.

Während der Rotation des Kegels wird die Intensität eines transmittierenden Messlichtstrahles, der die Kegel-Platte-Anordnung von unten durchdringt, mit einer Photodiode aufgenommen, mit einem Analog-Digital-Wandler gewandelt und mit einem Mikroprozessor weiterverarbeitet. Der Messwert wird auf einem Display angegeben.

Normwert:  $< 20$



### zu 3.3.8 Die Blutviskositätsmessung:

Es wurde ein Plasmaviskosimeter der Firma Fresenius, DreiEichen benutzt. Es besteht im wesentlichen aus einer Aluminiumplatte mit einer Nut zur Aufnahme des Kapillarschlauches (Polyurethanschlauch), der eigentlichen Messkapillaren, einer durchsichtigen Frontplatte, dem motorischen Vortrieb zum Füllen des Schlauches, der Schneidevorrichtung zum Durchtrennen des Schlauches als automatischer Start der Messung, den optoelektronischen Messwertaufnehmern (4 Lichtschranken), sowie der mikroprozessorgesteuerten Steuer- und Auswertelektronik.

Mit dem verwendeten Plasmaviskosimeter lässt sich auch die Blutviskosität bestimmen.

Diese Messung erfolgt, nachdem eine 2 ml Spritze luftblasenfrei mit den zu messenden EK-Blut aufgezogen und eine stumpfe Kanüle aufgesteckt wird. Die in der Spritze befindliche Luft wird abgepresst.

Der Polyurethanschlauch wird auf die stumpfe Kanüle aufgesetzt bzw. aufgezogen.

Das gesamte Set bestehend aus Spritze und Schlauch wird in die Nuten der Frontplatte eingelegt.

Die Blutviskositätsmessung beginnt nach Schließen der durchsichtigen, klappbaren Frontplatte. Der Spritzenkolben wird nun motorisch vorgetrieben und so der Kapillarschlauch blasenfrei gefüllt (Kontrolle an 1. Lichtschranke). Mit Erreichen der 2. Lichtschranke endet der Füllvorgang.

Schlauch und Blut werden innerhalb einer Minute auf 37°C erwärmt.

Der Schlauch wird anschließend durchtrennt. Die Blutflüssigkeit beginnt dadurch zu fließen und die Zeitmessung startet nach Erreichen der 3. Lichtschranke; sie läuft solange, bis die 4. Lichtschranke erreicht wird.

Aus dem Abstand der Lichtschranken und bekannter Messzeit wird die dynamische Viskosität nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz berechnet und angezeigt.

Normwert: < 1,3 mPa s (im Plasma)

### zu 3.3.9 induzierte Thrombozytenaggregation

Es wird ein Testkitt der Firma Wolf Greiner Biochemica GmbH Flacht verwendet.

Die Messung erfolgt mit dem Gerät Labor APACT der Firma Labor, vertrieben von der Firma Wolf Greiner.

Das Gerät wird nach dem Anschalten mit 500 µl PPP auf beiden Kanälen geeicht.

Für die eigentliche Messung werden in 3 Probengefäße je 450 µl PRP gegeben. Jeweils ein Gefäß gibt man in einen der 2 vorhergeeeichten Messkanäle und gibt unmittelbar nach Starten der Messung (Dauer 10 Minuten) 50 µl des entsprechenden Reagenz hinzu. Der parallel laufende Drucker zeichnet die ablaufende Reaktion in einer fortlaufenden Kurve auf. Die erhaltenen Kurven werden nach Ende der Messung mit Hand beschriftet und ausgewertet.

### zu 3.3.10 ATP -Bestimmung

Die Adenosin-5'-triphosphat-Reagenzien von der Firma Sigma Diagnostics sind zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von ATP in Blut bei 340 nm vorgesehen.

Die Kopplung spezifischer ATP-abhängiger Phosphorylierungen mit Redox-Systemen, die NAD/NADP- gebundene Enzyme verwenden, schaffen die Grundlage für verschiedene Methoden zur ATP-Bestimmung. Die Bildung von NAD wird dann durch Messung der Extinktionsänderung bei 340 nm quantifiziert.

Testprinzip:

#### 1. Reaktion

$\text{ATP} + 3 \text{ Phosphoglycerat} \xrightarrow{\text{Phosphoglyceratkinase (PGK)}} \text{aADP} + 1,3 \text{ Diphosphoglycerat}$

#### 2. Reaktion:

Das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPD) ist ebenfalls im Reaktionsgemisch vorhanden und katalysiert die folgende Reaktion:

1,3 Diphosphoglycerat + NADH – GAPD → αGlycerinaldehyd-3-Phosphat + NAD + P.

Die Oxidation von NADH zu NAD verursacht eine Extinktionsabnahme, die bei 340 nm gemessen wird. Die Extinktionsabnahme ist proportional zum ATP-Gehalt der Probe.

So lässt sich auf den gesuchten ATP-Gehalt schließen.

Reagenzien:

- NADH-Fläschchen
- Gepufferte PGA-Lösung
- GAPD/PGK-Enzymgemisch
- Trichloressigsäure-Lösung

Vorbereitung:

Die ATP-Reagenzien (Testkit) wurden gebrauchsfertig geliefert.

Gewinnung und Aufbewahrung der Proben:

Die Messung wurde schnellstmöglich nach der Probenentnahme durchgeführt, um ein Verfälschen der Ergebnisse durch unsachgemäßes Aufbewahren der Proben zu verhindern.

Bei einer Lagerung der Erythrozytenkonserven bei 4°C und der Entnahme der benötigten Blutmenge bei dieser Temperatur ist der ATP-Gehalt bis zu 24 Stunden konstant.

Da das Blut in ACD-Lösung entnommen wurde, ist auch der Verdünnungsfaktor (7/200)

bei der Berechnung berücksichtigt worden.

Testdurchführung:

Bestandteile des Testkits (s. o.)

Zusätzlich benötigte Materialien/Geräte:

- Schmalband-Spektrophotometer für 340 nm
- Küvetten
- Pipetten
- Zentrifuge
- Deionisiertes Wasser

Zubereitung des proteinfreien Überstandes:

1.

Zur Durchführung 1 ml 12%-ige Trichloressigsäure, sowie 1 ml Blut in ein Zentrifugenröhrchen zentrifugieren, das Ganze mischen und 5 Minuten in ein Eisbad stellen.

2.

10 Minuten zentrifugieren bei 3000 U, um einen klaren Überstand zu erhalten.

Testverfahren:

3.

Bei gegebener Reihenfolge werden diese Substanzen in ein 0,3 ml NADH-Fläschchen pipettiert:

-1 ml gepufferte PGA-Lösung

-1,5 ml Wasser

-0,5 ml Überstand (aus Schritt 2)

Anschließend mit einem Deckel verschließen und mehrmals umkehren, um das NADH aufzulösen.

4.

Dekantieren des gesamten Inhalts in eine Küvette.

Geeicht wird die anfängliche Extinktion (INITIAL A) bei 340 nm mit Wasser als Vergleichswert.

5.

0,04 ml GAPD/PGK-Enzymgemisch in die Küvette pipettieren. Durch Umkehren mischen und die Küvette in das Photometer zurückstellen.

6.

Die Extinktion bei 340 nm gegenüber Wasser als Vergleichswert ablesen und aufzeichnen.

Weiter ablesen, bis der Mindestextinktionswert erreicht ist (< 10 Minuten). Dieser Wert wird als FINAL A aufgezeichnet.

7.

Berechnung:

(Hinweis: Umrechnung von  $\mu\text{mol ATP}$  zu  $\text{mg ATP}$ :  $\mu\text{mol-Wert}$  mit 0,611 multipliziert)

$\Delta A = \text{INITIAL A} - \text{FINAL A}$

$\text{Blut-ATP } (\mu\text{mol/g} \cdot \text{Hb}) = \Delta A \cdot 195$

$\text{Hämoglobin-ATP } (\mu\text{mol/g} \cdot \text{Hb}) = \Delta A \cdot \text{Blut-Hämoglobin (g/dl)}$

Beispiel:

INITIAL A: 0,85

FINAL A: 0,645

$\Delta A: 0,805 - 0,645 = 0,160$

$\text{Blut-ATP } (\mu\text{mol/dl}) = 0,160 \cdot 195 = 31,2$

Referenzwerte:

Normbereiche: Blut-ATP ( $\mu\text{mol/dl}$ ): 38–62)

Hämoglobin-ATP ( $\mu\text{mol/g Hb}$ ): 3,65–4,45

### zu 3.3.11 PF 4

Verwendet wird ein Testkit der Firma Boehringer Mannheim, Diagnostica Stago.

Packungsinhalt:

- 1.) Mikrotitrationsstreifen, mit F(ab') PF 4 beschichtet, 3 Alubeutel mit je 2 Mikrotitrierstreifen à 16 Vertiefungen
- 2.) Antikörper POD-Konjugat 3 Fläschchen für 3\*8 ml Anti-PF4-Peroxidase
- 3.) Substrat 6 Tabletten à 2,0 mg o-Phenyldiamidin
- 4.) Pufferkonzentrat 1\*20 ml Albumin, Tween 20, Phosphatpuffer
- 5.) Waschlösungskonzentrat 1\*50 ml Natriumchlorid, Tween 20
- 6.) PF4-Standard 3 Fläschchen für 3\*2,0 ml Sollwert für PF 4

Zusätzlich erforderlich:

- Wasserstoffperoxid (30%, 7% oder 3%)
- Schwefelsäure (3mol/l, 25%) oder Salzsäure (1mol/l)
- CTAD-Tubes (Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridol)

Testprinzip

Sandwich-Essay

Bei der ersten Immunreaktion bindet der auf dem Mikrofiltrationsstreifen fixierte spezifische Antikörper gegen PF 4 das PF 4 der Probe.

PF 4 besitzt mehrere antigene Determinanten, daher werden in der anschließenden 2. Immunreaktion mit POD-markierten PF 4-Antikörpern Sandwich-Komplexe gebildet.

Die Menge der Sandwich-Komplexe stellt ein Maß für den PF 4-Gehalt der Probe dar.

Im nachfolgenden Waschschriff (bound-free-separation) wird das nicht gebundene POD-Konjugat entfernt.

Nach Zusatz von Wasserstoffperoxid und Chromogen (o-Phenyldiamin) wird die gebundene POD-Aktivität photometrisch bestimmt.

Normalwert:

CTAD-Plasma: 0–5 IU/ml

### zu 3.3.12 Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Human-Thrombin/Antithrombin III-Komplex (Enzygnost TAT micro der Firma DADE BEHRING)

Prinzip der Methode:

Enzygnost TAT micro ist ein Enzymimmunoassay nach dem Sandwich-Prinzip zur in-vitro-Bestimmung des Human-Thrombin/Antithrombin III-Komplex (TAT).

Während der ersten Inkubation bindet sich das in der Probe befindliche TAT an die Antikörper gegen Thrombin, die an der Oberfläche der Mikrofiltrationsplatte fixiert sind.

Nach dem Auswaschen werden in einer 2. Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Human-AT III an die freien Human-AT III-Determinanten gebunden.

Die überschüssigen enzym-konjugierten Antikörper werden ausgewaschen, anschließend wird die gebundene Enzymaktivität bestimmt. Die enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chromogen wird durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure unterbrochen. Die der Konzentration von TAT proportionale Farbintensität wird photometrisch bestimmt. Der Konzentrationsbereich von 2 bis 60 µg/l wird durch die in der Packung enthaltenen Standards abgedeckt. Bei höheren Konzentrationen muss die Probe vor der Messung entsprechend verdünnt werden.

### zu 3.3.13 Elastase

Verwendet werden Reagenzien der Firma Diagnostica Merck.

Reagenzien:

- 1) Puffer: TRIS-Puffer, pH 8,2 270mmol/l  
NaCl 230mmol/l  
EDTA 4,8mmol/l  
Stabilisatoren
- 2) Latex-Reagen: Polystyrol-Partikel beschichtet mit anti-PMN-Elastase F(ab')<sub>2</sub>
- 3) Antikörperfragmenten (Schaf), Zusatzstoffe

Die Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert.

Testprinzip:

Latex-Partikel werden mit Antikörperfragmenten gegen humane PMN-Elastase beschichtet. In Gegenwart von PMN-Elastase- $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor-Komplex (humanen Ursprungs) in der Testprobe kommt es zur Agglutination der Latexpartikel und zu einer Zunahme der Trübung im Reaktionsgefäß. Die Änderung der Trübung wird photometrisch bestimmt. Das Ausmaß der Trübung ist proportional zur Elastase-Konzentration in der Testprobe. Gemessen wird bei 37 °C und 700 nm Wellenlänge.

### zu 3.3.14 Beta-Thromboglobulin

Verwendet wird ein Testkit der Firma Boehringer Mannheim, Diagnostica Stago.

Packungsinhalt:

- 1.) Mikrotitrationsstreifen, mit F(ab) Antithromboglobulin beschichtet,  
3 Alubeutel mit je 2 Mikrotitrierstreifen à 16 Vertiefungen
- 2.) Antikörper POD-Konjugat 3 Fläschchen für 3\*8 ml Anti-Beta-Peroxidase
- 3.) Substrat 6 Tabletten à 2,0 mg o-Phenyldiamidin
- 4.) Pufferkonzentrat 1\*20 ml Albumin, Tween 20, Phosphatpuffer
- 5.) Waschlösungskonzentrat 1\*50 ml Natriumchlorid, Tween 20
- 6.) Beta-Thromboglobulin-Standard Sollwert für Beta-TG  
3 Fläschchen für 3\*2,0 ml

Zusätzlich erforderlich:

- Wasserstoffperoxid (30%, 7% oder 3%)
- Schwefelsäure (3mol/l, 25%) oder Salzsäure (1mol/l)
- CTAD-Tubes (Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridol)

Testprinzip

Sandwich-Essay

Bei der ersten Immunreaktion bindet der auf dem Mikrofiltrationsstreifen fixierte spezifische Antikörper gegen Beta-Thromboglobulin das Beta-Thromboglobulin der Probe.

Beta-Thromboglobulin besitzt mehrere antigene Determinanten, daher werden in der anschließenden 2. Immunreaktion mit POD-markierten Beta-Thromboglobulin-Antikörpern Sandwich-Komplexe gebildet.

Die Menge der Sandwich-Komplexe stellt ein Maß für den Beta-Thromboglobulin-Gehalt der Probe dar.

Im nachfolgenden Waschschritt (bound-free-separation) wird das nicht gebundene POD-Konjugat entfernt.

Nach Zusatz von Wasserstoffperoxid und Chromogen (o-Phenyldiamin) wird die gebundene POD-Aktivität photometrisch bestimmt.

Normalwert:

CTAD-Plasma: 10–40 IU/ml

### zu 3.3.15 Messung des Anaphylatoxins C5a in Humanem Plasma

Bestimmt wird das Anaphylatoxin C5a in Humanem Plasma durch einen Elisa-Test.

Benötigt wird dazu eine gebrauchsfertige Konjugat-Lösung der Firma AURICA DAG DIAGNOSTICS, die wie folgt hergestellt wird und für eine Platte ausreicht:

200 µl des Anti-human C5a/POD werden in ein Fläschchen mit 11ml Konjugat Puffer (C5a gegeben und ausreichend gemischt.

Nicht gelieferte, aber benötigte Materialien sind:

1. Tris Puffer (Tris/HCl Puffer pH 8.0 Tris (100mmol/l), NaCl (25mmol/l). Dieser Puffer kann bei DRG bestellt werden.
2. Zentrifuge passend für kleine Reagenzröhrchen (z.B. Eppendorf)
3. Pipetten: 50µl, 100µl, 200µl
4. Waschgerät: 0,3 ml dispenser oder ein automatisches Waschgerät, Absaugpumpe
5. Lesegerät: DRG E-LizaMat 3000 oder ein ähnliches für Microtiterplatten geeignetes Gerät, Wellenlänge 450 nm.

Vorbereitung und Aufbewahrung der Proben

Plasma wird in entsprechenden Röhrchen, die EDTA als Anti-Gerinnung enthalten, gesammelt und innerhalb von 2 Stunden ca. 10 Minuten bei mindestens 1500 x g zentrifugiert.

Der Plasmaüberstand wird entnommen.

Probenvorbereitung:

Um Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper mit ungespaltenem C5-Komplementfaktor auszuschließen, muss der C5 in Standards, Plasmakontrolle und Proben durch zentrifugieren entfernt werden. Nach dem Zentrifugieren, wird der klare Überstand, der den C5a enthält, getestet.

In die entsprechenden Zentrifugenröhrchen sind ein Volumen von entweder Probe, Standard oder Plasmakontrolle zu pipettieren und dann ein Volumenanteil der Präzipitationslösung. Für Doppelbestimmungen wird eine Volumenmenge von 100µl Probe und 100µl Präzipitationslösung empfohlen. Nach einem sofortigen gründlichen Mischen wird die Mischung für mindestens 3 Minuten bei 15°C bis 25°C inkubiert. Danach wird die Mischung mindestens 10 Minuten bei ungefähr 2500 x g zentrifugiert (oder mindestens 3 Minuten bei 8000 x g). Der klare Überstand wird für die Testdurchführung benutzt.

**Testdurchführung:**

1. Reagenzien vor Gebrauch auf Zimmertemperatur bringen.
2. Die benötigte Anzahl an Strips in den Rahmen setzen (jeder Strip enthält 8 Wells, je 2 Wells werden für Standard, Kontrolle und Probe benötigt.).
3. 50 µl Proben Puffer (C5a), Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells pipettieren.
4. 20 +/- 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Die Vertiefungen absaugen und insgesamt dreimal mit 300 µl verdünnter Waschlösung waschen und auf saugfähigem Papier gut ausklopfen.
6. 100 µl Konjugat in jede Vertiefung pipettieren. Die Platte gründlich schütteln, um eine komplette Vermischung von Konjugat und Proben zu erreichen.
7. 15 +/- 2 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
8. Die Wells dreimal wie in 5. beschrieben waschen.
9. 100 µl TMB Substratlösung in alle Wells geben.
10. Wieder 15 Minuten +/- 2 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.
11. 100 µl Stopplösung in alle Wells geben.
12. Direkt im Anschluss die Extinktion bei 450 nm messen.

**Ergebnisse:**

1. Aus den Doppelwerten der Absorption der Standards, Kontrollen und Proben wird jeweils der Mittelwert berechnet.
2. Auf linearem oder halblogarithmischem Papier werden in einem xy-Diagramm die Absorptionsmittelwerte der Standards (Y-Achse) gegen die Konzentration (X-Achse) in ng/l aufgetragen.
3. Die C5a-Konzentrationen der Kontrollen und Proben werden mit Hilfe der Standardkurve bestimmt.
4. Jede Probe, deren Konzentration höher als der höchste Standard ist, sollte mit 1:10 Verdünnung erneut getestet werden.

### zu 3.3.16 Thrombin-Antithrombin III-Komplexe zur Diagnose von Blutgerinnungsstörungen

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Human Thrombin/Antithrombin III-Komplex (Enzygnost® TAT der Firma DADE Behring)  
Enzygnost TAT micro ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Thrombin/Antithrombin III Komplex (TAT) in humanem Plasma zur Diagnose von Störungen der Blutgerinnung, die Veränderungen in der Aktivität des Gerinnungssystems mit sich bringen.

**Prinzip der Methode:**

Enzygnost® TAT micro ist ein Enzymimmunoassay nach dem Sandwich Prinzip zur in-vitro-Bestimmung des Human-Thrombin/Antithrombin III – Komplex (TAT).

Während der ersten Inkubation bindet sich das in der Probe vorhandene TAT an Antikörper gegen Thrombin, die an der Oberfläche der Mikrotitrationsplatte fixiert sind. Nach Auswaschen werden in einer zweiten Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Human AT III an die freien AT III-Determinanten gebunden. Die überschüssigen Enzym-konjugierten Antikörper werden ausgewaschen und anschließend wird die gebundene Enzymaktivität bestimmt. Die enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chromogen wird durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure unterbrochen.

Die der Konzentration von TAT proportionale Farbintensität wird photometrisch bestimmt.

Der Referenzbereich für TAT im Plasma liegt in der Normalpopulation bei 1,0-4,1 µg/l.